

LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS

María Enciso Lorences

Tesis Doctoral

Universidad Autónoma de Madrid

Septiembre de 2009

LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS

Memoria que presenta María Enciso Lorences para optar al grado de Doctor en Ciencias (Biológicas) por la Universidad Autónoma de Madrid.

María Enciso Lorences

Vº Bº del Director de la tesis doctoral:

**Jaime Gosálvez Berenguer
Catedrático de Genética
Departamento de Biología
Universidad Autónoma de Madrid**

“He visto una multitud de *animáculos*, más de mil, moviéndose en un volumen igual al de un granito de arena y con delgadas colas transparentes”

Antoni van Leeuwenhoek a William Brouncker, 1677.

ÍNDICE

1 RESUMEN	13
2 INTRODUCCIÓN	17
2.1 Sobre el espermatozoide	17
2.1.1 El espermatozoide en los mamíferos	17
2.1.2 La estructura del espermatozoide	18
2.1.3 La formación del espermatozoide	22
2.1.3.1 La espermatogénesis y la espermiogénesis	22
2.1.3.2 El testículo y el epitelio seminífero	24
2.1.3.3 La maduración en el epidídimo	25
2.1.3.4 La capacitación	26
2.1.4 El ADN del espermatozoide en los mamíferos	26
2.1.4.1 Diferencias con las células somáticas	27
2.1.4.2 La remodelación de la cromatina	29
2.1.5 La fragmentación del ADN del espermatozoide	33
2.1.5.1 El origen de la fragmentación del ADN del espermatozoide	33
2.1.5.2 La evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide	36
2.1.5.3 La importancia de la evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide. Relación de la fragmentación del ADN del espermatozoide con la fertilidad	38
2.2 Sobre aspectos particulares del estudio	44
2.2.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos	44
2.2.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele	45
2.2.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos	47
2.2.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida	48
2.2.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN	49

2.2.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.....	50
2.2.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración con la fragmentación del ADN.....	51
2.2.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.....	52
2.2.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN.....	52
2.2.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales.....	53
3 OBJETIVOS.....	57
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
4.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos.....	61
4.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele.....	65
4.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos.....	67
4.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida.....	71
4.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN.....	77
4.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.....	82
4.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración con la fragmentación del ADN.....	85
4.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.....	88
4.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN.....	90

4.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales.....	92
--	----

5 RESULTADOS.....99

5.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos.....	99
5.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele.....	101
5.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos.....	104
5.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida.....	107
5.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN.....	112
5.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.....	116
5.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración con la fragmentación del ADN.....	119
5.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.....	121
5.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN.....	123
5.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales.....	125

6 DISCUSIÓN.....129

6.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos.....	129
6.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele.....	131
6.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos.....	136
6.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida.....	139

6.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN.....	143
6.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.....	148
6.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración con la fragmentación del ADN.....	151
6.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.....	154
6.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN.....	156
6.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales.....	158
 7 CONCLUSIONES	 163
 8 FIGURAS	 168
 9 TABLAS	 302
 10 BIBLIOGRAFÍA	 349
 11 AGRADECIMIENTOS	 409
 12 PUBLICACIONES	 411

RESUMEN

1. RESUMEN

La fragmentación del ADN de los espermatozoides es un nuevo parámetro que se considera un indicador importante de la calidad seminal y la fertilidad. El espermatozoide es la célula encargada de transportar el material genético masculino al óvulo. La calidad de la información genética contenida en la molécula de ADN transmitida por el espermatozoide es importante para el correcto desarrollo del embrión. Varios trabajos han insistido en explorar la utilidad de este parámetro en la valoración de la calidad seminal y en la predicción del embarazo, de manera que existe una gran variedad de pruebas para estimar la integridad del ADN de los espermatozoides. En este trabajo se presentan dos técnicas nuevas para la determinación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. La primera, llamada Test de Dispersión de la Cromatina del Espermatozoide está basada en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos espermáticos a la descondensación. Esta técnica, desarrollada inicialmente para espermatozoides humanos, es adaptada en este estudio para su utilización en espermatozoides de otras especies de mamíferos. Se trata de una técnica rápida, sencilla y muy reproducible para la determinación del daño de ADN presente en una muestra de espermatozoides.

La segunda prueba presentada en este trabajo, es el ensayo cometa en dos dimensiones, este ensayo permite la evaluación simultánea de roturas de cadena doble y sencilla en el mismo espermatozoide. Se trata de una técnica también sencilla, fiable y muy reproducible para la determinación cuantitativa y cualitativa del daño de ADN en una muestra de espermatozoides. Con el uso de estas técnicas se profundiza en la utilidad de la determinación del índice de fragmentación en el diagnóstico del varicocele y en la predicción del embarazo en reproducción asistida. Además, se detalla la dinámica de la fragmentación del ADN *in vitro*, la relación de la fertilidad, la morfología, la maduración y la estructura de la cromatina del espermatozoide con la fragmentación del ADN y el efecto de la vacunación sobre la integridad del ADN. Estas técnicas se muestran especialmente útiles en la determinación de la calidad del material genético del espermatozoide. Su utilización podría orientar en el diagnóstico de algunas enfermedades como el varicocele y en la predicción del éxito o fracaso de embarazo en reproducción asistida así como contribuir en el estudio de la importancia, el origen y el tratamiento de la fragmentación del ADN en los espermatozoides de varias especies animales.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Sobre el espermatozoide

2.1.1 El espermatozoide en los mamíferos

Los espermatozoides fueron identificados por primera vez en 1677 por el holandés Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) y un joven estudiante llamado Johan Ham Van Arnheim (Schierbeek, 1953). En 1694, Nicolás Hartsoeker (1656-1725) en su *Essai de Dioptrique* propuso la teoría del homúnculo y publicó un dibujo de algo semejante a un cuerpo humano dentro de un espermatozoide. En esa época, se estaba lejos de considerar el papel que los espermatozoides podían tener como agentes en la generación de un nuevo ser, de hecho, la mayoría los consideraron parásitos (Bonnet y Spallanzani, 1773). La teoría de que los espermatozoides formaban parte del semen y que iniciaban y participaban en el desarrollo del cigoto no fue aceptada hasta 200 años después. A finales del siglo XVIII y en el siglo XIX se produjeron importantes progresos. Lázaro Spallanzani (1729-1799) demostró en un famoso experimento que si el semen se filtraba perdía su capacidad fecundante y que debería haber algo que quedaba en el filtrado que era responsable de la fecundación (Spallanzani, 1785). Si bien no logró identificar que éstos eran los espermatozoides, se trató de un gran avance. Jean-Louis Prevost (1790-1850) y Jean-Baptiste Dumas (1800-1884) descubrieron los espermatozoides en los testículos de diversos animales, repitieron los experimentos de Spallanzani y concluyeron que éstos no eran parásitos y que su contacto con el óvulo era esencial para la fecundación (Prevost y Dumas, 1824). Finalmente, en 1875, Hertwig (1849-1922) demostró que la fecundación consiste en la penetración de un espermatozoide en el óvulo (Hertwig, 1876).

Ahora sabemos que el espermatozoide (del griego *esperma*, semilla, y *zoon*, animal) es una célula haploide que constituye el gameto masculino de los animales, y que al fusionarse con el núcleo del gameto femenino forman un cigoto totipotente que dará lugar al embrión y posteriormente al feto.

El espermatozoide de los mamíferos es una célula muy especializada, con rasgos únicos que no están presentes en ningún otro tipo celular y completamente diferente al óvulo **Figura 1**.

Mientras que el gameto femenino es una célula grande con reservas de nutrientes e inmóvil, el espermatozoide es una célula 10.000 veces más pequeña, sin reservas y móvil. Una de las consecuencias inmediatas de esta anisogamia es que la proporción de gametos masculinos respecto de los femeninos es muy alta, ya que el macho produce millones de espermatozoides durante toda su vida y la hembra unos 400-500 óvulos desde el inicio de la etapa fértil hasta la menopausia.

El espermatozoide es la célula encargada de transportar el genoma paterno al óvulo. Además de la dotación cromosómica paterna, aporta el centrosoma, material perinuclear y algunos ARNs mensajeros al ovocito. También desencadena la activación de los recursos maternos almacenados en el ooplasma y de algunos genes durante el desarrollo embrionario inicial (Oliva y col., 2009).

2.1.2 La estructura del espermatozoide

El espermatozoide de los mamíferos está compuesto por una cabeza y una cola o flagelo recubiertos por una membrana plasmática (**Figura 2**).

La *cabeza* del espermatozoide está formada por el acrosoma y el núcleo.

El *acrosoma* es una gran vesícula secretora que contiene proteasas que favorecen la penetración del espermatozoide en el óvulo. Consta de una membrana externa que se pierde en la reacción acrosómica, y una membrana interna que posee moléculas receptoras que permiten la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito tras la reacción acrosómica (**Figura 3**).

El *núcleo* está formado por ADN hipercondensado, gracias a la unión a protaminas. Además, está cubierto por una envoltura nuclear reducida carente de poros nucleares y por la teca perinuclear que le confiere resistencia y protección (Longo y col., 1987; Oko, 1995; Ho y Suarez, 2003). Ésta se divide en tres regiones con funciones distintas en el proceso de fecundación: la capa subacrosomal, que se localiza bajo el acrosoma y está unida a la membrana interna de éste, probablemente, estabiliza las moléculas receptoras de la membrana interna del acrosoma (Gerton, 2002; Yoshinaga y Toshimori, 2003); el segmento ecuatorial, que

presenta receptores implicados en la unión inicial de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito una vez atravesada la zona pelúcida y alcanzado el espacio perivitelino (Toshimori y col., 1992) y, la capa postacrosomal, que contiene factores de señalización activadores del ovocito llamados SOAF (*Sperm Oocyte Activating Factors*) (Sutovsky, 2003) que se liberan tras la fusión de la cabeza del espermatozoide con el oolema activando el ovocito e iniciando el desarrollo del cigoto (**Figuras 3 y 4**).

El *flagelo* del espermatozoide está formado por el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal.

El *flagelo* proporciona movilidad al espermatozoide. Consta de una organización de microtúbulos en el axonema, 9+2, esto es, 9 dobletes de microtúbulos periféricos conectados mediante brazos de dineína y un par de microtúbulos central. Alrededor de los microtúbulos periféricos hay 9 fibras densas externas que proporcionan flexibilidad y consistencia a la estructura durante el movimiento. El flagelo del espermatozoide puede dividirse en 4 regiones que comparten la estructura interna anteriormente descrita (9+2 microtúbulos y 9 fibras densas exteriores) pero difieren en su estructura externa.

El *cuello* está compuesto por nueve columnas estriadas que son la continuación directa de las fibras densas externas de las otras regiones del flagelo. En el interior de estas 9 columnas está el *capitulum* que contiene, en la mayoría de los mamíferos, exceptuando los roedores, el centriolo proximal.

La *pieza media* está envuelta por una hélice de mitocondrias que proporcionan al espermatozoide la energía necesaria para el movimiento (**Figura 2 A**).

La *pieza principal* está separada de la pieza media por el *annulus*, un anillo transversal de material denso. Esta pieza está rodeada por la capa fibrosa, compuesta por dos columnas longitudinales paralelas a las fibras densas (**Figura 2 B**).

La *pieza terminal* contiene los dobletes del axonema, el final de las fibras densas y la capa fibrosa.

Características exclusivas según la infraclase Eutheria o Metatheria.

Aunque comparten estructuras comunes, los espermatozoides de los grupos Eutheria y Metatheria también presentan diferencias, principalmente en la cabeza, en su forma y rigidez; en la estabilidad del acrosoma y su membrana interna y, en la cantidad de enzimas acrosómicas.

En los mamíferos de la infraclase Eutheria, la cabeza de los espermatozoides presenta una forma generalmente oval. El acrosoma cubre los dos tercios anteriores del núcleo y el flagelo se inserta en la base de la cabeza. La cromatina nuclear está formada en su mayoría por protaminas cuyas cisteínas se reducen formando puentes disulfuro que estabilizan y fortalecen la estructura nuclear (**Figura 2**).

Los mamíferos de la infraclase Metatheria tienen una estructura de la cabeza del espermatozoide muy diferente. En las especies investigadas, la cromatina espermática es más frágil debido a que las protaminas carecen de cisteínas y no existen puentes disulfuro entre las fibras de cromatina salvo en los *Planigale* (Cummins, 1980; Retief y col., 1995b). En la mayoría de las especies de marsupiales, el núcleo forma una lámina perpendicular al flagelo que se inserta en el centro de la superficie ventral de éste. El acrosoma en este grupo de mamíferos generalmente tiene forma de boina (*flat cap*) y cubre parte de la superficie dorsal. En los púsum (Phalangeridae), canguros y wallabies (Macropodidae) cubre menos de la mitad de esta superficie, mientras que en los dasyúridos y bandicoots (Peramelidae) cubre una parte mayor (Temple-Smith, 1994) (**Figura 5**).

Los espermatozoides de dos grupos de marsupiales australianos, wombats y koalas (suborden Vombatiformes) tienen una estructura radicalmente diferente a la del resto. La cabeza del espermatozoide está muy curvada, el acrosoma se localiza dentro de la concavidad nuclear y la cola se inserta en la parte más baja de la superficie convexa de la cabeza (Temple-Smith, 1994; Breed y col., 2001) (**Figura 5**).

Estas diferencias estructurales en los espermatozoides de los grupos Eutheria y Metatheria parecen ser el resultado de la adaptación a cambios en la estructura de la zona pelúcida del ovocito. La zona pelúcida del espermatozoide del grupo Eutheria es más gruesa y

resistente a la acción de proteasas que la de los marsupiales (Rodger y Bedford, 1982b; Bedford y Breed, 1994). Las características de ambos gametos, condicionan el mecanismo de penetración del espermatozoide en el ovocito. En el caso de las especies del grupo Eutheria, aunque existe una liberación de las enzimas del acrosoma, se ha sugerido que esta penetración es más un proceso físico que enzimático (Bedford, 1998). Las características del espermatozoide de los mamíferos de la infraclase Eutheria, su forma y rigidez, ayudan a que esta penetración sea posible. En el caso de las especies del grupo Metatheria, la penetración parece consistir principalmente en una lisis enzimática de la zona pelúcida (Rodger y Bedford, 1982a).

Además de en la forma de la cabeza, existe una gran variación en el tamaño del espermatozoide y en las dimensiones de la pieza intermedia y la cola en las distintas especies (Gage, 1998; Morrow y Gage, 2000) (**Tabla 1**). Varios estudios han intentado explicar esta variación, algunos de ellos asocian positivamente la variación en el tamaño del espermatozoide a las dimensiones del tracto reproductivo femenino indicando una coevolución entre el espermatozoide y su ambiente de funcionamiento (Dybas y Dybas, 1981; Briskie y Montgomerie, 1992; Pitnick y col., 1995; Presgraves y col., 1999; Morrow y Gage, 2000). Otros, lo asocian, también de manera positiva, al riesgo de competición espermática (Gomendio y Roldan, 1991) e incluso al tamaño corporal (Cummins y Woodall, 1985).

Los tamaños de la cabeza, la pieza intermedia y el flagelo del espermatozoide parecen estar asociados (Cardullo y Baltz, 1991; Gage, 1998). El tamaño del flagelo influye en la velocidad del movimiento del espermatozoide. Los flagelos largos permiten mayores velocidades y fuerzas de empuje pero sobreviven periodos más cortos pues demandan más energía metabólica (Gomendio y Roldan, 1991; Gomendio y Roldan, 1993; Stockley y col., 1997; Levitan, 2000). El volumen de la pieza intermedia presenta una relación lineal positiva con la longitud del flagelo (Cardullo y Baltz, 1991), proporcionándole más energía. Se desconoce qué condiciona el tamaño de la cabeza del espermatozoide. Se podría pensar que está definido por el tamaño del genoma que alberga pero esto no parece ser determinante, el tamaño de la cabeza no está relacionado con el tamaño del haplotipo (Gage, 1998).

Los grupos de mamíferos Eutheria y Metatheria presentan tamaños del espermatozoide relativamente bien definidos. Los marsupiales presentan espermatozoides grandes que varían

desde 120 a 250 μm , aunque algunas especies tienen espermatozoides de tamaños más moderados, 70 μm (Cummins y Woodall, 1985). En el caso de los espermatozoides de los mamíferos del grupo Eutheria los tamaños están bastante conservados, el tamaño medio es 60 μm , excepto el orden Rodentia en el que la mayoría de las especies presentan espermatozoides de 120 μm (Cummins y Woodall, 1985). El análisis de los tamaños de los espermatozoides en mamíferos muestra que existe una relación de tamaños espermáticos en los distintos órdenes que debe estar controlada genéticamente.

2.1.3 La formación del espermatozoide

La *espermatogénesis* es el proceso encargado de la producción de espermatozoides en los testículos por medio de la meiosis a partir de las células germinales. La etapa final de este proceso se llama *espermioagénesis* y en éste se produce la diferenciación de los espermatocitos a espermatozoides (Alberts y col., 2007).

No obstante, la diferenciación del espermatozoide de los mamíferos no finaliza con la espermioagénesis, sino que continúa en el epidídimo, durante el proceso de maduración (Bedford, 1979; Yanagimachi, 1994a) y en el tracto reproductivo femenino durante la capacitación (Austin, 1952; Bedford, 1983; Visconti y col., 2002). Por tanto, el estudio de la diferenciación del espermatozoide ha de comprender todas estas etapas: espermatogénesis, espermioagénesis, maduración y capacitación (Esponda, 1985).

2.1.3.1 La espermatogénesis y la espermioagénesis

A pesar de las variaciones en la morfología del espermatozoide de las distintas especies de mamíferos, el proceso de la formación de espermatozoides en general y las distintas estructuras que aparecen, es similar en todas las especies. Este proceso de formación incluye tres fases (Holstein y Roosen-Runge, 1985; Alberts y col., 2007) (**Figura 6**).

Una primera *fase de proliferación* en la que tiene lugar la multiplicación de los gonocitos que originan las espermatogonias. Los gonocitos son células de gran tamaño con un núcleo esférico y voluminoso, que invaden las gónadas primarias cuando este órgano está muy poco diferenciado (Eddy y col., 1981). En la etapa embrionaria, se producen una serie de divisiones

mitóticas de los gonocitos primitivos que dan lugar a las espermatogonias tipo A, células indiferenciadas diploides que permanecen quiescentes hasta la etapa prepuberal. En este momento, en el testículo, el incremento en la producción de hormonas gonadotrópicas, induce la proliferación masiva de las espermatogonias tipo A. Durante sucesivas mitosis, estas células comienzan a diferenciarse, algunas persisten como células troncales o madre, renovándose de manera continua (espermatogonias tipo A), y otras continúan el proceso de formación de espermatozoides (espermatogonias tipo B). Estas espermatogonias tipo B, mediante mitosis, originan los espermatoцитos primarios (espermatoцитos I, células diploides).

En la siguiente fase, la *fase meiótica*, cada uno de los espermatoцитos I originados mediante la primera división meiótica produce dos espermatoцитos secundarios (espermatoцитos II, células haploides). A continuación, cada uno de estos espermatoцитos II completa la meiosis originando dos espermátidas (células haploides) que serán transformadas en espermatozoides durante la siguiente fase, la fase de *diferenciación* también llamada *espermiogénesis*.

Durante esta fase, se produce la especialización de las espermátidas en espermatozoides. Se reduce el tamaño del núcleo y se condensan los contenidos nucleares (Meistrich y col., 2003); el aparato de Golgi forma una gran vesícula que se desplaza a las proximidades del núcleo y finalmente lo encapsula (Moreno y col., 2000); y los centriolos se localizan en el extremo posterior del núcleo y originan el flagelo (Fawcett y Phillips, 1969; Oko, 1998). Finalmente, las mitocondrias se disponen alrededor de la parte anterior del flagelo formando la pieza intermedia (Cataldo y col., 1996) y el citoplasma y ciertos componentes celulares son desechados y fagocitados por las células de Sertoli (**Figura 7**).

La espermiogénesis concluye con la *espermiación*, en la que los espermatozoides diferenciados se separan del epitelio seminífero y se liberan a la luz del túbulo (Guraya, 1995). Estos espermatozoides, todavía inmaduros, tienen parte de citoplasma alrededor del cuello, esto es, la gota citoplásmica que será eliminada en el tránsito por el epidídimo (Cooper y Yeung, 2003).

2.1.3.2 El testículo y el epitelio seminífero

El testículo de los mamíferos está compuesto por la capa albugínea que forma tabiques que dividen el testículo en lóbulos. Cada uno de estos lóbulos contiene en su interior los túbulos seminíferos, encargados de la formación de los espermatozoides. Una vez formados, éstos son expulsados por los cilios del túbulo seminífero y la musculatura lisa que los rodea hacia la *rete testis* y de aquí a los conductos eferentes que drenan a la cabeza del epidídimo (región *caput*) (Figura 8).

En estos túbulos tiene lugar la espermatogénesis. Su histología es relativamente simple, constan de una membrana basal, células de Sertoli y células espermatogénicas (Alberts y col., 2007). Las células de Sertoli constituyen el sustento físico y nutricional del proceso de diferenciación, además, secretan hormonas y fagocitan los restos celulares producidos durante la diferenciación. Estas células forman una única capa que se extiende desde la lámina basal hasta la luz del túbulo. Están unidas unas a otras mediante uniones oclusivas localizadas cerca de la lámina basal, de manera que conforman dos compartimentos separados en el epitelio: el basal, en el que están dispuestas las espermatogonias; y el luminal, en el que se encuentran el resto de las etapas de la espermatogénesis. Estas uniones celulares forman la barrera hematotesticular. Esta barrera semipermeable impide a las células del sistema inmune infiltrarse en el lumen del epitelio seminífero evitando así el recubrimiento de los espermatozoides con anticuerpos que puedan dificultar su función. Las células espermatogénicas se disponen entre los citoplasmas de las células de Sertoli. En el curso de la espermatogénesis, las células germinales se trasladan gradualmente desde el lado basal del epitelio seminífero al luminal, de manera que las espermatidas se localizan en la periferia del túbulo seminífero y los espermatozoides se liberan a la luz del túbulo (Figura 9).

La organización de las células en el epitelio seminífero no sólo consiste en este esquema (Figura 9), el túbulo seminífero presenta una organización específica muy peculiar. Cuando se examina la sección histológica de un túbulo seminífero (Figura 10) se observa que las células aparecen en grupos sincrónicos, es decir, grupos que están en la misma etapa de diferenciación. Además, en estas secciones, no se observan todas las etapas de la espermatogénesis al mismo tiempo, los diferentes tipos de células aparecen en combinaciones definidas, con la misma

secuencia de fases ocupando áreas exactas en los túbulos (Leblond y Clermont, 1952; Clermont y Bustos-Obregon, 1968; Russell y col., 1993).

Este patrón se explica, por un lado, porque las células hijas generadas en cada paso meiótico permanecen unidas por puentes citoplasmáticos y, como resultado, las células de la misma fase se observan agrupadas. Por otro lado, en el epitelio seminífero se producen varias oleadas o ciclos espermatogénicos simultáneamente siguiendo una distribución helicoidal a lo largo del túbulo seminífero, de esta manera, en una región determinada del epitelio seminífero pueden observarse varias oleadas o ciclos (Phillips, 1974; Esponda, 1985; Holstein y Roosen Runge, 1985) (**Figura 11**).

Entre los canales seminales formados entre las células de Sertoli están las células intersticiales de Leydig. Éstas son células endocrinas que producen la testosterona que junto con la hormona estimuladora del folículo (FSH), son esenciales para que se produzca la espermatogénesis

2.1.3.3 La maduración en el epidídimo

Los espermatozoides liberados a la luz del túbulo seminífero son transportados por la red testicular (*rete testis*) y los conductos eferentes hasta alcanzar el epidídimo donde son almacenados hasta el momento de la eyaculación. El epidídimo es un tubo estrecho y alargado, situado en la parte posterior superior del testículo que conecta los conductos eferentes al conducto deferente. Tiene tres regiones bien diferenciadas: región *caput*, donde los conductos eferentes se unen al epidídimo; región *corpus* o central y región *cauda* que desemboca en el conducto deferente. En su paso por el epidídimo, los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que les proporcionan la capacidad de fecundar (Bedford, 1975). Estos cambios son: la pérdida de la gota citoplasmática (Breucker y col., 1985), la formación de puentes disulfuro en el núcleo y en algunas estructuras del flagelo (Calvin y Bedford, 1971; Bedford y Calvin 1974a) y varias modificaciones en la estructura de la membrana plasmática con efectos en la motilidad, la capacidad de capacitación y de reacción acrosómica (Mooney y col., 1972; Feuchter y col., 1981; Yeung y col., 1993). La mayoría de estos cambios

ocurren en las regiones *caput* y *corpus* (Bedford, 1979; Bustillo y Rajfer, 1986; Hirsh y col., 1993).

Durante la eyaculación, los espermatozoides son propulsados a través del conducto deferente y la uretra y se mezclan con el plasma seminal, es decir, con secreciones de las vesículas seminales, la próstata y las glándulas burboretrales. El plasma seminal permite la coagulación rápida del eyaculado en la parte posterior de la vagina que tras un tiempo recupera su fluidez. Debido a su ligera alcalinidad, proporciona el medio adecuado para que los espermatozoides sobrevivan en el ácido entorno vaginal. Además, activa la motilidad de los espermatozoides y les proporciona los nutrientes necesarios para mantener la motilidad.

Tras la eyaculación, un gran número de espermatozoides se encuentra en la parte posterior de la vagina cerca del cérvix uterino. El camino que han de seguir los espermatozoides hasta encontrarse con el ovocito en el ámpula de las trompas de Falopio es largo, a lo largo de este periodo, los espermatozoides experimentan un proceso de maduración llamado *capacitación*.

2.1.3.4 La capacitación

La fase final de la maduración espermática es la capacitación (Austin, 1952), ésta tiene lugar en el tracto genital femenino y requiere el contacto del espermatozoide con las secreciones del oviducto (De Jonge, 2005). Durante esta etapa se producen cambios y reorganizaciones de los componentes de la membrana plasmática (Cross, 2003; Harrison y Gadella, 2005) así como modificaciones en el acrosoma que permiten la reacción acrosómica (Michaut y col., 2000; Yunes y col., 2000). Además, el espermatozoide adquiere un movimiento con un fuerte batido del flagelo llamado hiperactividad (De Lamirande y Gagnon, 1993).

2.1.4 El ADN del espermatozoide en los mamíferos

El ADN del espermatozoide de los mamíferos está extremadamente condensado, es el ADN eucariótico más condensado, hasta 6 veces más que el cromosoma mitótico (Pogany y col., 1981; Braun, 2001). Esta condensación extrema sólo es posible gracias a sus componentes estructurales y a su organización específica.

2.1.4.1 Diferencias con las células somáticas

El núcleo de la células somáticas está organizado en unidades discretas llamadas *nucleosomas* en las que aproximadamente 200 pares de bases de ADN rodean, dando casi dos vueltas, un octámero de histonas (Olins y Olins, 1974; Felsenfeld, 1978; Lilley y Pardon, 1979; McGhee y Felsenfeld, 1980). A su vez, series lineales de estos nucleosomas (fibra 10 nm) se enrollan de manera radial en hélices regulares para formar la *fibra de 30 nm* también llamada *solenoides* (Finch y Klug, 1976; Bak y col., 1977; Marsden y Laemmli, 1979) (**Figura 12 A-C**). Sin embargo, y aunque existen algunos casos de espermatozoides empaquetados siguiendo este modelo de nucleosomas (Keichline y Wassarman, 1979; Kharchenko y Nalivaeva, 1979), el espermatozoide de los mamíferos no tiene volumen suficiente para albergar el ADN empaquetado de esta manera (Pogany y col., 1981), por tanto, requiere una organización de la cromatina distinta (Balhorn, 1982).

Varios estudios han revelado que el ADN del espermatozoide de la mayoría de los vertebrados está asociado a un tipo de proteínas llamadas *protaminas* (Balhorn, 1982). Las *protaminas* son pequeñas proteínas básicas, su tamaño es aproximadamente la mitad que el de las histonas y contienen entre un 55 y 70% de argininas (Coelingh y col., 1969; Bellve y col., 1975; Kawashima y Ando, 1978). Algunos animales presentan varios tipos de protaminas que difieren en la secuencia de aminoácidos, además el número de estas variantes varía de una especie a otra. Los espermatozoides de toro (Coelingh y col., 1972), cerdo (Tobita y col., 1983), oveja (Loir y Lanneau, 1975; Loir y Lanneau, 1978) y rata (Calvin, 1976; Kistler y col., 1976) contienen un solo tipo de protaminas mientras que el ratón tiene dos y los humanos tres (Puwaravutipanich y Panyim, 1975; Calvin, 1976; Sautière y col. 1988).

Balhorn en 1982 propone un modelo para la estructura de la cromatina del espermatozoide, en el que detalla cómo se unen las protaminas al ADN y la forma en la que se establecen las interacciones entre las protaminas. El modelo describe que las protaminas, en su segmento central rico en argininas, adoptan una estructura extendida que se une al ADN en el surco menor. Esta unión neutraliza las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN de manera que la repulsión electrostática desaparece y los complejos ADN-protaminas cercanos pueden aproximarse y unirse de manera estrecha (Feughelman y col., 1955). Para minimizar el

volumen, el modelo propone que la parte de las protaminas que no está unida al surco menor de una molécula de ADN, se coloca en el surco mayor de las moléculas de ADN adyacentes. De manera que los surcos menores de una molécula se yuxtaponen con los surcos mayores de la siguiente. Los complejos ADN-protaminas se unen unos a otros lateralmente mediante fuerzas de van der Waals en una estructura lineal (**Figura 12**). En este modelo, el ADN no presenta superenrollamiento (Risley y col., 1986; Ward y col., 1989; Ward y Coffey, 1991). En el espermatozoide, el ADN está organizado de manera más compacta que en las células somáticas pero menos enrollado. El modelo propone también la forma en la que se establecerían las interacciones entre las protaminas en algunos mamíferos. Las protaminas se unen por los extremos alrededor del ADN mediante la formación de puentes disulfuro inter e intra protaminas.

Cómo se organiza tridimensionalmente esta estructura ha sido también motivo de estudio para muchos investigadores. En las células somáticas la fibra de 30 nm se organiza uniéndose cada 60.000 pares de bases de ADN a una estructura llamada matriz nuclear formando una serie de bucles o asas superenrolladas (Cook y col., 1976; Vogelstein y col., 1980; Pienta y Coffey, 1984) (**Figura 12 D-E**). Esta estructura permite la organización de la cromatina de manera tridimensional en el núcleo (Nelson y col., 1986) y varía según el tipo celular (Fey y Penman, 1988; Getzenberg y col., 1990). Cada bucle de cromatina representa una unidad de replicación cuyo origen está asociado permanentemente a la matriz (Vogelstein y col., 1980; Buongiorno-Nardelli y col., 1982; Dijkwel y col., 1986; Vaughn y col., 1990).

Esta estructura de bucles asociados a una matriz nuclear también está presente en la cromatina del espermatozoide (**Figura 12 J**) (Ward y col., 1989; Sotolongo y Ward, 2000). En ortópteros se ha descrito la presencia de un ADN triplex responsable del anclaje de estos bucles a la matriz (Cerná y col. 2007). Los bucles de ADN de los espermatozoides difieren de los de las células somáticas en el tamaño, son más pequeños, y en la ausencia de superenrollamiento (Risley y col., 1986; Ward y col., 1989; Ward y Coffey, 1991). El tamaño de los bucles no parece estar relacionado con el contenido haploide del ADN del espermatozoide sino con su función. El tamaño de los bucles de ADN se ha correlacionado en distintas especies con el tamaño de la unidad de replicación (Buongiorno-Nardelli y col., 1982) y se ha comprobado que las unidades de replicación en el tejido embrionario tienen un tamaño menor que en el tejido adulto (Hyodo y

Flickinger, 1973; Flickinger y col., 1986). Es posible, por tanto, que el tamaño de los bucles de ADN en los espermatozoides esté relacionado de manera funcional con la embriogénesis.

Se sabe que el ADN está organizado en bucles unidos a la matriz nuclear pero, ¿cómo están empaquetados estos bucles en el núcleo del espermatozoide? Algunos experimentos de hibridación *in situ* de los centrómeros (Moens y Pearlman, 1989; Haaf y col., 1990) y el cromosoma Y (Guttenbach y Schmid, 1990; Wyrobek y col., 1990) revelan que éstos se localizan en centros discretos dentro del núcleo. Estos datos sugieren que los bucles de ADN deben estar plegados en pequeños dominios dentro del núcleo. Otros experimentos realizados con microscopía de fuerza atómica describieron que el ADN de los espermatozoides está enrollado en grandes nódulos de tamaño suficiente para contener el equivalente a un replicón de ADN (Koehler y col., 1983; Allen y col., 1993).

Basándose en estas evidencias, Ward en 1993 propone un modelo de plegamiento de los bucles de ADN en el núcleo del espermatozoide. En este modelo, cada bucle de ADN se estructura de manera circular en anchos círculos concéntricos superpuestos y se pliega en una estructura toroidal de aproximadamente 65 nm de diámetro (Hud y col., 1993; Brewer y col., 1999; Brewer y col., 2003). Estos toroides están conectados por segmentos compuestos por cromatina más sensible a agentes dañinos como la ADNasa I llamados *toroid linkers* o *conectores* (Sotolongo y col., 2003) (**Figura 12 H-K**).

2.1.4.2 La remodelación de la cromatina

Aunque no se conoce del todo, el proceso de remodelación de la cromatina está bastante documentado. Durante este proceso, las histonas que conforman los nucleosomas en las células somáticas son reemplazadas en primer lugar por proteínas de transición y finalmente por protaminas (Steger y col., 1998; Wouters-Tyrou y col., 1998; Meistrich y col., 2003), de manera que se elimina la organización del ADN de las células somáticas.

Las *proteínas de transición* son un grupo heterogéneo de proteínas básicas. En la rata (Kistler y col., 1975), el ratón (Kleene y col., 1988), el cerdo, el toro (Kremling y col., 1989), la oveja (Chirat y col., 1991) y el hombre (Luerssen y col., 1988) se han identificado cuatro

proteínas de transición (TP 1-4). De éstas, la TP1 y TP2 son las mejor caracterizadas. La TP1 es una proteína pequeña de 54 aminoácidos rica en arginina, lisina y serina, algunas poseen cisteínas (Kremling y col., 1989; Chirat y col., 1991). La TP2 es una proteína de mayor tamaño que la 1, de entre 117 y 138 aminoácidos dependiendo de la especie, que contiene gran número de residuos de serina, prolina y cisteína (Cole y Kistler, 1987). Se sabe poco sobre las funciones específicas de las proteínas de transición. Parece que estas proteínas estabilizan el ADN tras la eliminación de los supenrenrollamientos y promueven la condensación (Levesque y col., 1998). Además, se ha propuesto que también participan en la reparación de las roturas de ADN que se producen durante la espermiogénesis (Caron y col., 2001a; Kierszenbaum, 2001). En algunos experimentos realizados *in vitro*, se ha comprobado que la TP1 disminuye la temperatura de fusión del ADN (Singh y Rao, 1987) y reduce la interacción del ADN con el *core* del nucleosoma (Singh y Rao, 1988; Akama y col., 1998). La actividad *in vitro* de la TP2 es distinta, aumenta la temperatura de fusión del ADN y compacta el ADN en el nucleosoma (Kundu y Rao, 1996; Akama y col., 1997). Sin embargo, aunque *in vitro* estas proteínas tienen funciones muy distintas, *in vivo*, parece que la falta de alguna de las TPs puede ser compensada por un incremento en el nivel de la presente (Yu y col., 2000; Adham y col., 2001).

Las *protaminas* son proteínas muy básicas de bajo peso molecular que están asociadas al ADN en los núcleos espermáticos maduros. Se han identificado dos tipos de protaminas en varios mamíferos, las protaminas 1 y 2. La protamina 1 es un polipéptido de unos 50 aminoácidos rico en arginina y cisteína. Su secuencia puede dividirse en tres dominios estructurales: la región amino-terminal que se caracteriza por la secuencia ARYRCC y la presencia de serina y treonina en la posición 8. Una región central rica en argininas que se presume que es la que se une al ADN, y una región carboxilo-terminal variable que contiene la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos. La protamina 2 es un poco más grande, entre 54 y 62 aminoácidos, y posee una gran cantidad de residuos de histidina. La zona central está constituida principalmente por varios grupos de 3 ó 4 residuos de arginina mientras que la histidina y la cisteína están localizadas a intervalos irregulares a lo largo de la molécula (Dadoune, 2003).

Cómo se produce el reemplazo de histonas por protaminas no está muy claro, pero parece estar asociado a modificaciones en la estructura de la cromatina como la acetilación

(Meistrich y col., 1992; Pivot-Pajot y col., 2003), la metilación (Sims y col., 2003), la fosforilación (Prigent y Dimitrov, 2003; Zhang y col., 2004) o la degradación por ubiquitinización (Chen y col., 1998; Baarends y col., 2000; Jason y col., 2002). Se ha propuesto que estas modificaciones definen señales específicas que son reconocidas por determinados factores capaces de modificar la estructura y función de determinados dominios de la cromatina (Jenuwein y Allis, 2001; Govin y col., 2004; Khorasanizadeh, 2004). Las modificaciones más estudiadas son la acetilación y la degradación por ubiquitinización. Se cree que la acetilación facilita sustitución de las histonas por protaminas y que la ubiquitinización está implicada en la eliminación de las histonas. Además, las histonas somáticas son sustituidas por variantes testiculares, histonas específicas del testículo (Lewis y col., 2003) que se ha visto que están implicadas en determinadas funciones como la descompactación de la cromatina (De Lucia y col., 1994; Khadake y Rao, 1995) o la reparación del ADN (Malik y Henikoff, 2003).

Se desconoce el mecanismo molecular de eliminación de los nucleosomas, sin duda los factores anteriormente descritos han de estar involucrados. La eliminación de los nucleosomas genera un gran número de superenrollamientos libres que no están presentes en el espermatozoide maduro, de manera que estos superenrollamientos han de ser eliminados. Esta eliminación de los superenrollamientos se produce mediante la introducción de roturas de cadena sencilla o doble en el ADN. Un solo corte por bucle de ADN no es suficiente para liberar la tensión torsional de éste, ni siquiera si todos los nucleosomas se liberan a la vez (Boissonneault, 2002). Se cree que los superenrollamientos se eliminan gradualmente a medida que los nucleosomas se liberan, y, para que el cambio topológico sea eficiente, se necesita un número considerable de roturas (**Figura 13**). De hecho, varios estudios detectan numerosos cortes en el ADN durante las fases intermedias de la espermiogénesis (McPherson y Longo, 1993a; Sakkas y col., 1995; Smith y Haaf, 1998).

El origen de estas roturas no se conoce bien, pero es evidente que se requiere una actividad nucleasa endógena. Se ha propuesto la topoisomerasa II (Roca y Mezquita, 1989; McPherson y Longo, 1993b) como responsable de la creación y reparación de estos cortes, aunque se ha sugerido que deben existir otros mecanismos pues, en ratones, las alteraciones en el proceso de condensación del ADN de los espermatozoides no están siempre asociadas a alteraciones en el nivel de topoisomerasa II (Boissonneault, 2002).

Tras la eliminación de los superenrollamientos se necesita un mecanismo eficiente para reparar los cortes producidos en el ADN, pues estas lesiones no se detectan en las etapas finales de la espermatogénesis. Parece que el proceso de condensación iniciado por las proteínas de transición y completado por las protaminas juega un papel importante en la reparación de estas roturas. De hecho, algunos estudios han correlacionado alteraciones en el estado de condensación del ADN de los espermatozoides con altos niveles de fragmentación (Gorczyca y col., 1993a; Manicardi y col., 1998; Aoki y col., 2006; Bouchaib y col., 2007). Se ha comprobado *in vitro* que tanto las TP1 y 2 como las protaminas, estimulan la oligomerización de pequeños fragmentos de ADN en presencia de la ligasa T4 (Sheflin y col., 1991; Levesque y col., 1998). Algunos trabajos han propuesto que las proteínas de transición son las únicas candidatas para participar en la reparación pues las protaminas no se detectan en etapas coincidentes con la reestructuración de las roturas de ADN en las espermátidas alargadas (Caron y col., 2001a). Las proteínas de transición, gracias a su capacidad para neutralizar los grupos fosfato negativos, permiten que los extremos libres del ADN se aproximen lo suficiente como para que actúe la ligasa. Pueden actuar como factores de alineamiento, en las roturas de cadena sencilla (Caron y col., 2001a; Pradeepa y Rao, 2007), o como puente entre fragmentos de ADN próximos entre sí en las roturas de cadena doble (Levesque y col., 1998).

Sin embargo, aunque las proteínas básicas nucleares promueven la aproximación de las cadenas de ADN, ni las proteínas de transición ni las protaminas, poseen una actividad ligasa. Además de la topoisomerasa II, se piensa que la ADN ligasa III específica del testículo (ADN ligasa III β) podría participar en la formación de los puentes fosfato del ADN (Mackey y col., 1997; Chew y col., 2000; Caron y col., 2001a; Caron y col., 2001b).

El siguiente paso es la condensación de la cromatina. En la compactación participan dos procesos: la fosforilación y defosforilación de los residuos de serina y treonina de las protaminas (Marushige y Marushige, 1978; Mayer y col., 1981) y la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas (Bedford y Calvin, 1974b; Rodman y col., 1979; Balhorn y col., 1991; Ward y Coffey, 1991). En las etapas finales de la espermiogénesis, cuando las protaminas son transportadas al núcleo una vez sintetizadas, se fosforilan de manera masiva (Papoutsopoulou y col., 1999; Wu y Hecht, 2000). Esta fosforilación facilita la unión de las protaminas al ADN y va seguida de una defosforilación que parece estar asociada con el

aumento de la condensación de la cromatina del espermatozoide (Oliva y Dixon, 1991). A continuación se forman puentes disulfuro entre los grupos tiol de las protaminas adyacentes que confieren estabilidad a la cromatina (Marushige y Marushige, 1978; Balhorn y col., 1984). Se ha comprobado en distintas especies animales que esta estabilización de la cromatina comienza en el testículo y continúa en el tránsito por el epidídimo (Saowaros y Panyim, 1979; Tobita y col., 1983; Huang y col., 1984; Shalgi y col., 1989; Yossefi y col., 1994).

La función de la extremada condensación de la cromatina del núcleo del espermatozoide no está muy clara. Se cree que la estabilidad y compactación que las protaminas confieren al núcleo lo protegen en su tránsito hacia el ovocito. Las protaminas condensan tanto el ADN que lo hacen resistente tanto al estrés mecánico como a la sonicación (Yanagida y col., 1991; Tateno y col., 2000) e incluso a la ebullición (Yanagida y col., 1991). Además, la condensación del ADN del espermatozoide parece importante para la fecundación, en concreto para la penetración de las capas que rodean al ovocito (Bedford y Calvin, 1974b). Aún con este nivel de condensación los espermatozoides son susceptibles de daño, la adecuada organización de la cromatina en el espermatozoide es importante para protegerlo de los efectos nocivos de muchos agentes genotóxicos. Los defectos en la organización de la cromatina se han asociado en muchos casos con la infertilidad.

2.1.5 La fragmentación del ADN del espermatozoide

2.1.5.1 El origen de la fragmentación del ADN del espermatozoide

El mecanismo exacto por el que las anomalías de la cromatina nuclear se producen en los espermatozoides no se conoce, pero se han propuesto tres posibles orígenes. En primer lugar, se cree que podría ser el resultado del empaquetamiento anormal de la cromatina durante la espermiogénesis; en segundo lugar, consecuencia de la apoptosis defectuosa antes de la eyaculación; y por último, inducido por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el eyaculado.

Empaquetamiento anormal de la cromatina espermática

Durante la espermiogénesis tiene lugar una reorganización de la cromatina espermática en la que se reemplazan las histonas por protaminas. Se postula que en este proceso es necesaria la actividad de enzimas que corten y ligen el ADN en determinadas etapas de la espermiogénesis (Marcon y Boissonneault, 2004) liberando el estrés de torsión y facilitando la protaminación y el empaquetamiento de la cromatina (McPherson y Longo, 1992; McPherson y Longo, 1993a; McPherson y Longo, 1993b). Un fallo en la reparación de estos cortes podría provocar que el espermatozoide llegara al eyaculado con su ADN fragmentado. De modo que, la presencia de roturas en el ADN de los espermatozoides eyaculados podría ser indicativa de un proceso de maduración incompleto (Manicardi y col., 1995; Ollero y col., 2001).

Apoptosis defectuosa antes de la eyaculación

La apoptosis es una muerte celular programada estrictamente regulada utilizada por las células somáticas para el desarrollo adecuado, la homeostasis y la eliminación de células dañadas o peligrosas (Kerr y col., 1972). Se caracteriza por condensación de la cromatina, cambios en la membrana plasmática, fragmentación de ADN, externalización de ciertos componentes de la membrana interna y fragmentación celular originando cuerpos apoptóticos (Nagata, 2000; Alberts y col., 2007).

En los testículos de los mamíferos, las células germinales se expanden clonalmente en varias rondas de mitosis antes de iniciar su diferenciación a espermatozoides maduros. Esta expansión es excesiva y está equilibrada por un mecanismo de apoptosis selectivo (Billig y col., 1996; Sinha Hikim y Swerdloff, 1999). Un fallo en esta apoptosis permitiría que espermatozoides morfológicamente anómalos, con funciones bioquímicas irregulares y/o con daño de ADN, no fueran eliminados y estuvieran presentes en el eyaculado, indicando que ha tenido lugar un mecanismo apoptótico incompleto (Gorczyca y col., 1993a; Sakkas y col., 2002; Weng y col., 2002). La presencia en los espermatozoides del eyaculado de marcadores apoptóticos podría ser el resultado no sólo de una apoptosis abortiva sino también de una apoptosis iniciada tras la eyaculación. Se ha visto que ciertas nucleasas endógenas pueden activarse en determinadas

condiciones y son capaces de digerir la cromatina del espermatozoide (Maione y col., 1997; Sotolongo y Ward, 2000; Sotolongo y col., 2003; Jones, 2004; Sotolongo y col., 2005).

Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el eyaculado

La presencia de estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino tiene lugar cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) por parte de los leucocitos activados y/o macrófagos (Saleh y Agarwal, 2002; Agarwal y col., 2003), de los espermatozoides anormales (Gil-Guzman y col., 2001) y/o se produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen (Saleh y Agarwal, 2002), y la producción de ROS supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal.

Las ROS son agentes oxidantes altamente reactivos que pueden provocar roturas en el ADN del espermatozoide (Aitken y Krausz, 2001; Aitken y col., 2003). En diversos estudios se ha descrito que la presencia de niveles altos de ROS es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide (Kodama y col., 1997; Aitken y col., 1998; Lopes y col., 1998a; Saleh y Agarwal, 2002; Moustafa y col., 2004).

Otros factores

Otros factores físicos y químicos que parece que afectan al ADN de los espermatozoides son: la temperatura elevada (Sailer y col., 1997; Banks y col., 2005) tanto por un proceso febril (Evenson y col., 2000) como por un entorno laboral inapropiado (Oliva y col., 2001), la exposición a tóxicos ambientales o industriales (Sanchez-Pena y col., 2004; Rubes y col., 2005), el tabaco (Potts y col., 1999; Saleh y col., 2002b), la cafeína (Schmid y col., 2007), el cáncer (O'Flaherty y col., 2008), ciertos tratamientos como la quimioterapia (Fossa y col., 1997; Stefankiewicz y col., 2006) y la radioterapia (Morris, 2002), ciertas deficiencias hormonales (Xing y col., 2003; Meeker y col., 2008), la edad avanzada (Singh y col., 2003a; Wyrobek y col., 2006; Schmid y col., 2007), el sobrepeso (Kort y col., 2006) etc.

De todos modos, lo más probable es que la presencia de ADN fragmentado en un espermatozoide maduro sea el resultado de la combinación de diferentes procesos. Los mecanismos propuestos podrían operar de manera conjunta. Es fácil asumir que el daño

generado por ROS esté asociado a un proceso apoptótico o que la persistencia de roturas resultado de una espermiogénesis anormal en un espermatozoide sea señalizada para su eliminación mediante apoptosis.

2.1.5.2 La evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide

En la actualidad se dispone de varios ensayos para la evaluación de la integridad de la cromatina del espermatozoide.

Ensayo SCSA

La técnica SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente (Evenson y Jost, 1994). El grado de desnaturalización resultante tras un tratamiento ácido se determina midiendo el cambio metacromático del fluorocromo naranja de acridina de fluorescencia verde a fluorescencia roja (Darzynkiewicz y col., 1975; Evenson y col., 1980). Las cadenas dobles de ADN de los espermatozoides que tienen el ADN fragmentado pasan a ser cadenas sencillas, mientras que en aquellos espermatozoides con el ADN intacto se mantienen como cadenas dobles. El fluorocromo naranja de acridina se intercala entre las cadenas dobles como un monómero emitiendo fluorescencia verde y se liga a las cadenas sencillas como un agregado emitiendo fluorescencia roja (Van Duijn, 1954). El cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia roja más la verde permite calcular el índice de fragmentación de ADN (DFI) de una muestra. En este ensayo, el DFI es una medida de la cantidad de cromatina de un espermatozoide que puede ser desnaturalizada por tratamiento ácido.

Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling*) detecta roturas de ADN de cadena sencilla y doble en una reacción enzimática catalizada por una transferasa terminal (Gavrieli y col., 1992; Gorczyca y col., 1993a, b) que une nucleótidos (dUTP) modificados al grupo hidroxilo libre del extremo 3'. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la incorporación de nucleótidos. La cuantificación

de los nucleótidos incorporados puede realizarse microscópicamente o mediante citometría de flujo.

Ensayo *In Situ* Nick Translation

El ensayo de *In situ* Nick Translation (ISNT) cuantifica la incorporación de nucleótidos (dUTPs) modificados a las roturas de ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por una ADN polimerasa I. Este ensayo identifica espermatozoides con niveles variables de daño de ADN (Gorczyca y col., 1993b; Manicardi y col., 1995). Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la incorporación de dUTPs. La cuantificación de los nucleótidos incorporados se realiza microscópicamente.

Ensayo DBD-FISH

La técnica DBD-FISH (*DNA Breakage Detection by Fluorescence in situ Hybridization*) permite la detección de roturas de ADN mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Las roturas de ADN generan extremos de ADN de cadena sencilla a los que puede acceder la sonda. Cuantas más roturas tenga el ADN, mayor será la señal de hibridación. La cuantificación de la sonda hibridada se realiza microscópicamente (Fernández y col., 1998; Fernández y col., 2000; Fernández y Gosálvez, 2002).

Ensayo SCGE

El ensayo SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*), también conocido como ensayo *cometa*, consiste en la lisis y posterior electroforesis de células incluidas en un microgel de agarosa. Cuando el ADN descondensado de un espermatozoide se somete a la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen parecida a un cometa. La cantidad de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud y la densidad de la cola del cometa (Ostling y Johanson, 1984; Singh y col., 1988).

Test SCD

El test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) se basa en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos de los espermatozoides cuando se someten a una desnaturalización ácida suave y a una posterior lisis de proteínas. Cuantificando los núcleos de cromatina dispersa y los núcleos condensados se puede estimar la fragmentación nuclear (Fernández y col., 2003; Fernández y col., 2005; Enciso y col., 2006).

A pesar de las diferencias metodológicas, los resultados de la mayoría de estos ensayos correlacionan entre sí (Chohan y col., 2006).

2.1.5.3 La importancia de la evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide. Relación de la fragmentación del ADN del espermatozoide con la fertilidad

La cromatina espermática es una estructura compleja y su integridad es fundamental para la transmisión segura de la información genética y para el mantenimiento de la buena “salud genética” de las generaciones futuras. El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y se requiere para la fecundación, el desarrollo del embrión y el correcto desarrollo fetal y posnatal.

Aunque se han realizado enormes progresos en la comprensión de la fisiología del espermatozoide y de los mecanismos de interacción con el óvulo, todavía no está claro qué pruebas sirven para valorar la funcionalidad de un espermatozoide y predecir su funcionamiento. El análisis del semen sigue siendo la prueba clínica de laboratorio más importante de que se dispone para la evaluación del factor masculino. Los espermioigramas habituales se centran en la determinación de la concentración, la morfología y la motilidad de los espermatozoides, complementada con la posible valoración de ciertas pruebas funcionales y de determinados parámetros bioquímicos y enzimáticos del semen (WHO, 1999). Es evidente que el número y la concentración de los espermatozoides, su movilidad y su normalidad morfológica son factores importantes en la determinación de la probabilidad de éxito de un embarazo, tanto *in vivo* como *in vitro* (McLachlan y col., 2003). De hecho, los hombres fértiles tienen unos valores medios de estos parámetros seminales superiores a los de los hombres infértiles, aunque, hay un

solapamiento considerable entre estos grupos, aproximadamente un 15% de los varones estériles presenta un espermograma normal (Guzick y col., 2001).

Aunque constituye un pilar esencial para la evaluación de la esterilidad, en muchos casos el análisis del semen convencional no permite detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide que condicionan su funcionalidad. Se necesitan nuevos marcadores capaces de discriminar mejor los hombres fértiles de los infértiles y de predecir el éxito de embarazo y el riesgo de aborto.

La integridad del ADN del espermatozoide se ha reconocido en los últimos años como un parámetro importante indicador de la calidad seminal y la fecundidad. Algunos estudios indican que el daño de ADN está asociado con anomalías en los parámetros seminales convencionales (Kodama y col., 1997; Irvine y col., 2000; Tomlinson y col., 2001; Saleh y col., 2003a; Acharyya y col., 2005). En otros casos, sin embargo, se ha visto que la integridad del ADN del espermatozoide es independiente de estos parámetros sugiriendo que su evaluación podría proporcionar información adicional (Spano y col., 1998; Evenson y col., 1999; Larson y col., 2000; Giwercman y col., 2003; Fraser, 2004). Además, se ha reconocido que el daño de ADN puede ser la explicación de un elevado porcentaje de casos de infertilidad idiopática (Evenson y col., 1999; Host y col., 1999; Saleh y col., 2002a). Aunque las anomalías de la cromatina espermática suelen estar presentes en hombres con una producción anormal de esperma y espermogramas anormales, el 8% de los hombres con parámetros del espermograma normales tienen una integridad de ADN anormal (Zini y col., 2001). En algunos casos, estas lesiones en el ADN podrían ser reparadas por el citoplasma del ovocito; en otros, la integridad del ADN es crucial para conseguir la fecundación, el desarrollo del embrión y un correcto desarrollo fetal y postnatal.

Aunque, de momento, la integridad del ADN del espermatozoide no se mide de forma sistemática en el laboratorio de andrología, parece que podría ser un marcador interesante de la calidad seminal capaz de discriminar mejor los hombres fértiles de los infértiles y de predecir el éxito de embarazo y el riesgo de aborto. Además, el estudio del daño espermático es particularmente importante en una era en la que es muy frecuente el uso de técnicas de reproducción asistida. La transmisión iatrogénica de defectos genéticos es posible, pues estas

técnicas suponen un salto en los mecanismos de selección espermática natural e incrementan las posibilidades de que un espermatozoide con material genético alterado pueda fecundar un ovocito (Twigg y col., 1998b; Aitken, 1999; Gandini y col., 2004). En este contexto, parece prudente evaluar la integridad de la cromatina del espermatozoide en hombres infértiles antes de la reproducción asistida.

Relación entre la fragmentación del ADN espermático y la fecundación, el desarrollo embrionario y el embarazo en humanos

Varios trabajos han examinado la relación entre el daño de ADN del espermatozoide y la capacidad de una pareja para concebir de manera natural (Evenson y col., 1999; Spano y col., 2000; Loft y col., 2003; Evenson y Wixon, 2008). Estos estudios sugieren que existe una asociación fuerte entre el daño de ADN espermático y el fracaso de embarazo natural.

En el caso de la inseminación artificial intrauterina (IUI), algunos estudios han asociado niveles altos de daño de ADN espermático con tasas de embarazo bajas (Duran y col., 2002; Bungum y col., 2007), otros sin embargo, no han encontrado tal asociación (Muriel y col., 2006).

En la fecundación *in vitro* (FIV), algunos estudios comprueban que la tasa de fecundación correlaciona de manera negativa con la fragmentación del ADN del espermatozoide (Host y col., 2000; Aitken, 2004; Huang y col., 2005; Benchaib y col., 2007). En otros casos, no se encuentra asociación entre la tasa de fecundación y el daño de ADN del espermatozoide (Henkel y col., 2003; Frydman y col., 2008). Cuando se evalúa la influencia de la integridad del ADN en las tasas de embarazo tras FIV convencional los estudios indican que el daño de ADN espermático está asociado, aunque débilmente, al descenso de las tasas de embarazo mediante FIV (Host y col., 2000; Henkel y col., 2003; Boe-Hansen y col., 2006; Borini y col., 2006; Benchaib y col., 2007; Collins y col., 2008; Frydman y col., 2008; Zini y Sigman, 2009). Estas observaciones sugieren que el daño de ADN espermático tiene un impacto modesto en las tasas de embarazo mediante FIV.

En el caso de la inyección intracitoplasmática (ICSI), los resultados son controvertidos. Algunos estudios afirman que el daño del ADN espermático se relaciona inversamente con la

tasa de fecundación (Lopes y col., 1998b). Además, parece que la proporción de espermatozoides con fragmentación de ADN influye negativamente en la tasa de implantación de los embriones obtenidos mediante ICSI y puede ser un buen valor predictivo en los casos de fallo recurrente en la implantación de embriones de buena calidad (Benchabib y col., 2003; Larson-Cook y col., 2003). Por el contrario, algunos estudios concluyen que la fecundación mediante ICSI no se ve interrumpida por niveles altos de daño de ADN en el espermatozoide inyectado ni en el caso de espermatozoides procedentes del eyaculado, ni del testículo. En estos estudios no se ha observado el efecto negativo de los espermatozoides con ADN defectuoso en la fecundación (Twigg y col., 1998b; Henkel y col., 2003; Aitken, 2004; Lewis y col., 2004; Zini y col., 2005b), ni tampoco en el embarazo (Gandini y col., 2004; Huang y col., 2005; Lin y col., 2008). Dos revisiones sistemáticas de los estudios realizados en ICSI indican que el daño de ADN espermático no tiene un impacto medible en las tasas de embarazo mediante ICSI (Collins y col., 2008; Zini y Sigman, 2009). Es posible que el proceso de selección de espermatozoides y embriones que tiene lugar en ICSI mitigue el potencial efecto adverso del daño de ADN espermático en el resultado de la reproducción.

Aunque la fecundación pueda ser, en determinadas circunstancias, independiente de la integridad del ADN del espermatozoide, parece que el desarrollo posfecundación del embrión puede interrumpirse por este daño. Esta interrupción del desarrollo embrionario, está asociada presumiblemente a un fallo en la transcripción de genes dañados procedentes del genoma paterno (Braude y col., 1988; Tesarik y col., 2004; Tesarik, 2005). En los ciclos de reproducción asistida, el desarrollo embrionario correlaciona de manera negativa con el daño de ADN (Sun y col., 1997; Sakkas y col., 1998; Ahmadi y Ng, 1999; Morris y col., 2002; Virro y col., 2004).

La fragmentación del ADN del espermatozoide se ha asociado también con la tasa de abortos. Varios estudios recogen la relación que existe entre el daño de ADN espermático y la pérdida del embarazo tras las técnicas de FIV e ICSI (Carrell y col., 2003a; Carrell y col., 2003b; Saleh y col., 2003a; Zini y col., 2005b; Borini y col., 2006; Benchabib y col., 2007; Lin y col., 2008). Una revisión sistemática y un metaanálisis de los estudios realizados muestran que el daño de ADN espermático está asociado con un aumento significativo de las tasas de aborto tras FIV e ICSI (Zini y Sigman, 2009).

A pesar de que parece que los espermatozoides con el ADN dañado presentan una capacidad de fecundación y establecimiento de un embarazo viables estadísticamente menor, se ha comprobado que, en algunos casos, estos espermatozoides son capaces de fecundar y de conseguir que un embarazo llegue a término (Twigg y col., 1998b; Gandini y col., 2004). Las consecuencias de este daño en la salud de la descendencia todavía no se conocen. Algunos estudios han comprobado que la infertilidad por la presencia de una delección en el cromosoma Y se transmite al 100% de la descendencia masculina (Silber y Repping, 2002). Estudios en animales han demostrado que los espermatozoides dañados por exposición a agentes terapéuticos del cáncer pueden tener efectos adversos en la descendencia como translocaciones, mutaciones y malformaciones (Trasler y Doerksen, 1999; Hales y Robaire, 2001). Por último, algunos trabajos relacionan los errores de impronta genómica paterna no sólo con una embriogénesis y tasa de embarazo anormal sino también con el desarrollo de algunas patologías serias (Falls y col., 1999; De Rycke y col., 2002; Gosden y col., 2003).

En conclusión, en la actualidad se dispone de bibliografía en la que se evidencia que el daño del ADN espermático puede influir en el éxito de la reproducción humana. La aparente disparidad en algunas observaciones puede ser explicada por la variedad de las técnicas empleadas en la determinación del daño del ADN espermático, así como por el recurso a técnicas de reproducción asistida en pacientes con diversas etiologías y no sólo en los afectados de un factor masculino. No obstante, hay evidencias clínicas que muestran que el daño de ADN del espermatozoide es perjudicial para la fecundación, el desarrollo embrionario y el embarazo y que los espermatozoides de los hombres infértiles contienen más daño de ADN que los de los hombres fértiles. Sin embargo, la comprensión de la etiología del ADN espermático y el impacto de este defecto en el resultado de la reproducción siguen siendo muy elementales. Se necesitan más estudios para definir completamente el valor del análisis del daño de ADN del espermatozoide humano y el ensayo o combinación de ensayos adecuados para esto.

Relación entre la integridad del ADN espermático y la fecundación, el desarrollo embrionario y la preñez en animales

Aunque se ha obtenido mucha información sobre la fragmentación del ADN del espermatozoide a partir de estudios realizados en espermatozoides humanos, los trabajos

disponibles en animales son escasos. Los pocos estudios efectuados en mamíferos apuntan en la misma dirección que los realizados en humanos, un alto nivel de fragmentación parece estar asociado con una fertilidad reducida (Evenson y Jost, 1994; Rybar y col., 2004).

Varios estudios han explorado los efectos perjudiciales de la preservación del semen en la integridad del ADN del espermatozoide en distintas especies.

En espermatozoides de cerdo, se han detectado cambios en la integridad del ADN durante la conservación tanto en medio líquido como congelado (Fraser y Strzezek, 2004; Boe-Hansen y col., 2005; Fraser y Strzezek, 2005; Perez-Llano y col., 2006). Las condiciones de dilución y el tiempo de almacenamiento también parece que afectan a la integridad del ADN (Boe-Hansen y col., 2005; Perez-Llano y col., 2006). En el caso de los espermatozoides de caballo, parece que la integridad de la cromatina se reduce como resultado del almacenamiento a bajas temperaturas (Linfor y Meyers, 2002; Baumber y col., 2003; Love y col., 2005). Algunos trabajos recientes han estudiado el efecto de la conservación de muestras de semen de distintas especies animales (cerdo, caballo, oveja) a 37°C (Lopez-Fernández y col., 2007; Lopez-Fernández y col., 2008a; Lopez-Fernández y col., 2008b) comprobando que la integridad del ADN de los espermatozoides disminuye a lo largo del periodo de incubación.

La mayoría de los trabajos sobre la fragmentación de ADN realizados en mamíferos han estudiado la influencia del daño de ADN en el desarrollo embrionario y la fertilidad. Estos estudios asocian los niveles altos de fragmentación de ADN en espermatozoides con tasas de fertilidad y viabilidad embrionaria reducidas en especies como el toro (Ballachey y col., 1987; Bochenek y col., 2001; Januskauskas y col., 2003; Madrid-Bury y col., 2005), el cerdo (Evenson y col., 1994; Boe-Hansen y col., 2008), el caballo (Love y Kenney, 1998) y el ratón (Ahmadi y Ng, 1999). Boe-Hansen y col. (2008) comprueban que existe una relación entre la fragmentación del ADN en espermatozoides de cerdo y la fertilidad. En este trabajo muestran que el SCSA es capaz de identificar individuos con fertilidad reducida con respecto al tamaño de la camada. Karabinus y col. (1990) relacionaron de manera negativa la tasa de no retorno con el índice de fragmentación de ADN calculado mediante SCSA en los espermatozoides bovinos. Los resultados de este estudio apoyan las relaciones publicadas de la estructura de la cromatina con la fertilidad en estos animales (Ballachey y col., 1986; Ballachey y col., 1987; Ballachey y col.,

1988; Dobrinski y col., 1994; Januskauskas y col., 2000; Bochenek y col., 2001; Januskauskas y col., 2003; Madrid-Bury y col., 2005).

En el caso de los espermatozoides de caballo también se han observado niveles de fragmentación de ADN superiores en el semen de individuos subfértiles que en el de individuos fértiles (Kenney y col., 1995). Además, varios trabajos comprueban que la integridad del ADN de los espermatozoides correlaciona de manera negativa con la tasa de embarazo estacional tanto en grupos de caballos de fertilidad diversa (Kenney y col., 1995; Morrell y col., 2008) como en grupos de caballos fértiles (Love y Kenney, 1998).

Algunos autores han propuesto la existencia de un umbral de daño de ADN espermático por encima del cual el desarrollo embrionario y el embarazo se impiden. Ciertos estudios clínicos realizados en espermatozoides humanos indican que los niveles de fragmentación del ADN superiores al 30% son prácticamente incompatibles con el inicio y mantenimiento de un embarazo a término (Evenson y col., 1999; Larson y col., 2000; Evenson y Wixon, 2008). En el caso de otros mamíferos, algunos autores han tratado de definir estos umbrales. En espermatozoides de cerdo se ha comprobado que individuos con índices de fragmentación de ADN espermático superiores al 15-20% presentan descensos apreciables en la tasa de fertilidad (Rybar y col., 2004). En espermatozoides de toro, se ha visto que medidas del índice de fragmentación por encima del 20% están asociadas con tasas de fertilidad bajas (Ballachey y col., 1988; Karabinus y col., 1990). En el caballo, Love (2005) sugirió que los niveles de fragmentación de ADN de espermatozoides de caballo por encima del 27% estaban asociados a fertilidad reducida.

2.2 Sobre aspectos particulares del estudio

2.2.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos

La fragmentación del ADN de los espermatozoides se ha considerado en los últimos años como una de las causas importantes de infertilidad masculina (Agarwal y Said, 2003; Sakkas y col., 2003). Sin embargo, y aunque la integridad del ADN parece un buen indicador de la calidad espermática, no se valora de manera rutinaria en el laboratorio clínico de análisis

seminal (De Jonge, 2002). La mayoría de las técnicas disponibles para detectar la fragmentación del ADN espermático: el ensayo TUNEL (Gavrieli y col., 1992; Gorczyca y col., 1993a,b), el ensayo de ISNT (Gorczyca y col., 1993b, Manicardi y col., 1995), el ensayo cometa (Ostling y Johanson, 1984; Singh y col., 1988) o el SCSA (Evenson y Jost, 1994), son laboriosas, requieren instrumentación cara o el uso de enzimas cuya actividad y accesibilidad a las roturas puede verse dificultada por la extrema condensación de la cromatina del espermatozoide. De manera que estos procedimientos son más adecuados para el campo de la investigación que para la utilización rutinaria en el laboratorio de andrología.

En los últimos años se ha desarrollado otro procedimiento para determinar la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos llamado test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides (SCD) (Fernández y col., 2003; Fernández y col., 2005). Este test está basado en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos de los espermatozoides cuando se someten a una desnaturalización ácida suave y una posterior desproteinización.

El objetivo de este primer estudio es comprobar que el test SCD es una prueba rápida, fiable y reproducible para la evaluación de la cantidad de daño de ADN presente en una muestra de espermatozoides humanos. También se pretende probar la eficacia de los soportes informáticos de análisis de imagen *Leica Qwin Pro* y *Velocity* para identificar espermatozoides con distintos niveles de daño.

2.2.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele

El varicocele se ha considerado durante años como la principal causa de infertilidad masculina (Schlesinger y col., 1994; Benoff y Gilbert, 2001; Hauser y col., 2001). Ocurre aproximadamente en entre el 15 y el 20% de la población general masculina, especialmente en adolescentes, en el 19-41% de los hombres que siguen un tratamiento de infertilidad y aproximadamente en el 80% de los hombres con infertilidad secundaria. A pesar de los numerosos trabajos publicados sobre el tema, los mecanismos patogénicos mediante los cuales el varicocele induce la disfunción testicular y la infertilidad no se conocen completamente (Marmar, 2001), pues ciertas cuestiones sobre los efectos del varicocele en la cantidad y la

calidad espermática y el mecanismo mediante el cual el varicocele produce fallos en la espermatogénesis son difíciles de abordar.

El varicocele se caracteriza por estasis venosa, temperatura testicular elevada y acumulación de metabolitos tóxicos en los testículos (Comhaire, 1991; Sweeney y col., 1995; Benoff y col., 2004). En 1973, Zorngiotti y Macleod proporcionaron evidencias que demostraron que la temperatura escrotal en el varicocele era superior a lo normal (+0,6-0,8°C). En un estudio posterior, Goldstein y Eid (1989) obtuvieron medidas directas de las temperaturas intratesticulares y confirmaron que los pacientes con varicocele tenían temperaturas significativamente superiores comparadas con el control (34°C) tanto para el testículo izquierdo (+2,7°C) como para el derecho (+2,4°C).

El varicocele también conduce a una producción elevada de ROS y altas tasas de apoptosis, tanto en los testículos como en el semen (Simsek y col., 1998; Barbieri y col., 1999; Hendin y col., 1999). Los espermatozoides son particularmente sensibles al estrés oxidativo pues sus membranas plasmáticas están llenas de ácidos grasos poliinsaturados y tienen concentraciones bajas de enzimas catalasas en sus citoplasmas (Saleh y Agarwal, 2002).

También se ha detectado una elevada frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en el eyaculado de sujetos con varicocele en comparación con sujetos fértiles (Chen y col., 2004; Saleh y col., 2003b). Se sabe poco sobre los mecanismos celulares responsables de las bajas tasas de fertilidad en el varicocele pero la combinación de estos factores podría ser responsable de esto.

El objetivo de este segundo estudio es determinar la fragmentación del ADN espermático, usando el test SCD, en muestras pertenecientes a pacientes infértiles con varicocele detallando el perfil relativo de las diferentes categorías de daño de ADN nuclear y compararlo con los resultados obtenidos en hombres fértiles e infértiles de diferente etiología. Además en un intento de profundizar en el origen del daño de ADN espermático en estos pacientes, se postula que éste podría ser el resultado de la temperatura elevada y el alto nivel de producción de ROS característicos de esta patología. Se trata de probar la hipótesis de que la

producción anormal de espermatozoides con un nivel alto de daño de ADN en pacientes con varicocele es el resultado del estrés calórico, el estrés oxidativo o la combinación de ambos.

2.2.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos

El ensayo cometa fue desarrollado en 1984 por Ostling y Johanson. En este ensayo, las células inmersas en una matriz de agarosa sobre un portaobjetos de cristal se lisan con detergentes y sales en altas concentraciones dando lugar a núcleos desproteinizados llamados *nucleoides*. A continuación, el ADN se somete a una electroforesis en la que las hebras de ADN roto migran hacia el ánodo formando, a partir del nucleoide, una estructura de morfología similar a un cometa. Cuanto más grande y/o densa sea la cola del cometa, mayor será el daño de ADN. Se han desarrollado dos tipos de ensayo cometa: el ensayo cometa neutro, en el que el ADN migra en condiciones neutras, para la identificación de roturas de ADN de cadena doble (Olive y col., 1991), y el ensayo cometa alcalino, en el que el ADN se mueve en condiciones alcalinas que desnaturalizan el ADN y detecta roturas de ADN de cadena sencilla y doble sin distinción (Singh y col., 1988).

Además del ensayo cometa, existen otros métodos para evaluar la integridad de la cromatina de los espermatozoides, los más populares son: SCSA (Evenson y Jost, 1994), ISNT (Manicardi y col., 1995) y TUNEL (Gavrieli y col, 1992; Gorczyca y col., 1993a, b). Otras alternativas son el DBD-FISH (Fernández y col., 2000) y el test SCD (Fernández y col., 2003), pero ninguno de estos métodos es capaz de discriminar entre roturas de ADN de cadena sencilla y doble simultáneamente en la misma célula. La identificación del tipo y la cantidad de daño de ADN presente en los espermatozoides podría tener implicaciones clínicas y biológicas importantes, pues la reparación por parte del ovocito de las roturas de ADN de cadena doble parece más difícil que la reparación de roturas de ADN de cadena sencilla (Khanna y Jackson, 2001). Esto mismo se podría aplicar a las roturas de ADN de cadena sencilla a gran escala. Las versiones neutra y alcalina del ensayo cometa son capaces de distinguir ambos tipos de roturas, pero no de manera simultánea en el mismo ensayo, sino que son necesarios dos experimentos independientes. En este tercer estudio se presenta un ensayo cometa modificado, el ensayo cometa en dos dimensiones, para identificar ambos tipos de roturas de ADN, a la vez, en la misma célula. El objetivo es validar la capacidad del ensayo cometa 2D para caracterizar

simultáneamente roturas de ADN de cadena sencilla y doble en el mismo espermatozoide humano.

2.2.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida

Durante los últimos 30 años, el uso de la reproducción asistida ha aumentado sustancialmente (Katz y col., 2002). Actualmente, las técnicas de reproducción asistida se proponen de manera habitual como terapia para paliar los problemas de fertilidad. La IUI es la primera opción de tratamiento en las parejas con infertilidad de factor masculino no severo, infertilidad idiopática, hostilidad del mucus cervical y problemas ovulatorios (Requena y col., 2002). Este tratamiento precede normalmente a otras opciones más caras como la FIV o la ICSI.

En todas estas técnicas de reproducción asistida, los espermatozoides se procesan previamente. Los protocolos de preparación de espermatozoides para reproducción asistida más utilizados son la centrifugación en gradiente de densidad y el *swim up*. La capacidad de estos métodos para aislar espermatozoides funcionalmente competentes podría ser decisiva en el resultado de la técnica de reproducción aplicada. Hasta la fecha no hay consenso sobre cuál es el mejor método para aislar espermatozoides funcionalmente competentes ni tampoco sobre el efecto de estas técnicas en la integridad del ADN.

Se han propuesto muchos factores pronóstico para la IUI: la edad de la mujer (Hendin y col., 2000), el grosor del endometrio y el número de folículos en la ovulación, la etiología y la duración de la infertilidad (Khalil y col., 2001), la presencia y el tipo de estimulación ovárica, el tiempo y el número de inseminaciones (Ragni y col., 1999), el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (Ombelet y col., 1997), la motilidad (Hendin y col., 2000) y el número total de espermatozoides móviles inseminados (Van der Westerlaken y col., 1998). En el caso de la FIV y la ICSI, los factores pronósticos sobre la probabilidad de éxito son, antes de la aplicación del tratamiento, la edad de la paciente y el origen de su esterilidad (Lim y Tsakok, 1997; De la Rochebrochard y Thonneau, 2002; Pellestor y col., 2003). Una vez efectuada la técnica, los principales condicionantes de la probabilidad de gestación son: la edad de la mujer (Padilla y

Garcia, 1989) y el número y la calidad de los embriones transferidos (Hydén-Granskog y col., 2005; Salumets y col., 2006).

Sin embargo, el análisis seminal estándar sigue siendo el estudio más usado en la evaluación de la pareja infértil, a pesar de que su valor pronóstico, en reproducción asistida, es escaso (Bonde y col., 1998; Host y col., 2001). En base a los parámetros seminales convencionales se decide el tratamiento que sigue una pareja, de manera que, algunos pacientes siguen terapias carísimas de FIV o ICSI cuando no hay tratamiento o, por el contrario, se tratan con IUI o FIV convencional cuando lo que se tenía que haber aplicado es la ICSI. La identificación de características espermáticas capaces de predecir el éxito de las distintas técnicas de reproducción asistida es de suma importancia en el tratamiento de la infertilidad.

En los últimos años varios autores han demostrado que la integridad del ADN influye en el proceso de la fecundación tanto natural como asistida (Agarwal y Said, 2003; Sakkas y col., 2003) y en el desarrollo normal del embrión (Brinkworth, 2000). El objetivo de este cuarto estudio es determinar la utilidad del índice de fragmentación evaluado mediante el test SCD y el ensayo cometa 2D en la predicción del embarazo en reproducción asistida, por un lado en la IUI y, por otro, en FIV e ICSI. Además, se pretende comprobar la eficacia de los protocolos de procesamiento de muestras seminales, centrifugación en gradiente de densidad y *swim up* en la eliminación de espermatozoides con roturas de ADN y la influencia que éstos pueden tener en el resultado de las distintas técnicas de reproducción asistida estudiadas.

2.2.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN

A pesar de su reconocido valor en humanos, el análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides de especies animales de interés comercial, apenas se ha abordado. Sólo se han realizado contados estudios aplicando el test SCSA. Así, resultados muy preliminares usando dicho test en ganado vacuno (Karabinus y col., 1990), ovino (Sailer y col., 1995) y porcino (Gillan y col., 2005; Boe-Hansen y col., 2008) establecen una correlación entre la tasa de fragmentación del ADN y la disminución de fertilidad en estas especies. Estos escasos resultados animan a intentar implementar el test SCD para poder analizar, de forma sencilla, los

niveles de fragmentación del ADN en espermatozoides de diferentes especies animales. El propósito de este quinto estudio es ajustar el protocolo del test SCD para su utilización sobre espermatozoides de cerdo y mostrar la estrecha correlación que existe entre las imágenes de halos generadas por la aplicación del test SCD en semen de cerdo y las pruebas moleculares que suscriben la presencia de ADN fragmentado.

Por otro lado, se pretende analizar la estabilidad del ADN de los espermatozoides de cerdo en muestras de semen conservadas en distintos diluyentes y condiciones de preservación en un intento de aclarar la dinámica de la fragmentación de ADN *in vitro* y dilucidar los posibles mecanismos implicados.

2.2.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN

Las anomalías morfológicas del espermatozoide se han asociado desde hace tiempo con infertilidad masculina y esterilidad en la mayoría de las especies de animales estudiadas (Ombelet y col., 1995; Ostermeier y col., 2001; Kubo-Irie y col., 2005). De hecho, el número de espermatozoides, la motilidad y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal son criterios que se usan habitualmente para evaluar la calidad seminal en muchos animales. La estructura del espermatozoide y su morfología parece que juegan un papel importante en la fecundación y el embarazo (Wiltbank, 1986; Karabinus y Gelety, 1997; Saacke y col., 2000; Hauser y col., 2001). Lo mismo ocurre con la integridad del ADN, muchos estudios afirman que existe relación entre los niveles altos de daño de ADN y algunos problemas reproductivos (Ballachey y col., 1987; Evenson, 1999; Rubio y col., 2001; Agarwal y Said, 2003; Evenson y Wixon, 2006). La influencia de ambos parámetros, la morfología espermática y la integridad del ADN en la capacidad masculina para fecundar, sugiere que estos parámetros puedan estar relacionados y que un espermatozoide morfológicamente anormal tenga probablemente una estructura de la cromatina defectuosa, o un alto nivel de daño de ADN. Varios estudios coinciden al afirmar que una morfología espermática deficiente se asocia estadísticamente con anomalías cromosómicas (Viville y col., 2000; Calogero y col., 2001; Kovanci y col., 2001; Lewis-Jones y col., 2003; Sun y col., 2006), inestabilidad de la cromatina (Kubo-Irie y col., 2005) o estructura anormal de la cromatina (Celik-Ozenci y col., 2004).

En este sexto estudio se explora la relación entre la fragmentación del ADN del espermatozoide y la presencia de anomalías morfológicas clasificadas según los criterios definidos por Blom. El objetivo es examinar la posible correlación entre el daño de ADN y las anomalías morfológicas presentes en el mismo espermatozoide con la idea de dilucidar si el daño de ADN puede influir la presencia de cierto tipo de anomalías morfológicas en el espermatozoide bovino o viceversa.

2.2.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración del espermatozoide con la fragmentación del ADN

El epidídimo de los mamíferos es el lugar donde los espermatozoides, funcionalmente incompetentes originados en el testículo, sufren una maduración final que les proporciona la capacidad para fecundar el ovocito. Este proceso implica una serie de modificaciones bioquímicas y biofísicas que estabilizan gradualmente la mayoría de las estructuras del espermatozoide, los componentes de la cromatina, la pieza intermedia y la cola (Bedford, 1975).

Durante la espermiogénesis de los mamíferos tiene lugar un importante proceso de remodelación de la cromatina. Este proceso en la mayoría de los mamíferos tiene dos fases principales: la sustitución de histonas por protaminas (Bellve y col., 1975; Goldberg y col., 1977) y la formación de numerosos puentes disulfuro entre las protaminas (Haidl, 1994; Said y col., 1999). Este cambio en la estructura de la cromatina requiere la aparición transitoria de roturas en el ADN para facilitar el intercambio de histonas por protaminas y eliminar la mayoría de los superenrollamientos presentes en la cromatina de las células somáticas (Risley y col., 1986; Ward, 1994). El origen de estas roturas de ADN y el mecanismo molecular implicado no se conoce bien y tampoco el mecanismo de reparación se ha detallado en profundidad.

El objetivo de este séptimo estudio es explorar el nivel de fragmentación de ADN y de protaminación en espermatozoides de ratón pertenecientes a distintas partes del epidídimo para intentar aclarar los cambios que se producen en el proceso de maduración de los espermatozoides en el epidídimo y la presencia de roturas de ADN en este proceso.

2.2.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN

En los últimos años se han evaluado varios parámetros seminales en los caballos de cría con la idea de encontrar alguno capaz de predecir la fertilidad potencial de una muestra. Entre otros, la integridad del ADN se considera un buen candidato pues se cree que está íntimamente relacionada con la fertilidad masculina. Algunos estudios, realizados usando el test SCSA en espermatozoides de caballo, revelan que el aumento en la cantidad de roturas de ADN de cadena sencilla en muestras de semen está asociado con una fertilidad reducida (Kenney y col., 1995; Love y Kenney, 1998). También se ha demostrado que las tasas de desnaturalización de la cromatina espermática son superiores en el semen de caballos subfértiles comparado con el de los caballos fértiles y que la tasa de desnaturalización correlaciona negativamente con la tasa de embarazo estacional (Kenney y col., 1995). En este octavo estudio se presenta una adaptación del test SCD para detectar fragmentación de ADN en espermatozoides de caballo tanto en muestras de semen frescas como congeladas. El objetivo de este estudio es validar la eficacia del test en la detección de daño de ADN en muestras de semen de caballo comparando los índices de fragmentación obtenidos con los determinados mediante el ensayo de ISNT. Además, se analizará el DFI de 23 muestras de caballo criopreservadas, comparando los DFIs calculados con la tasa de embarazo y el número de servicios por embarazo, con la idea de probar la eficacia del test en el análisis de la fertilidad.

2.2.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN espermático ha sido el objeto de muchos estudios en los últimos años tanto en humanos (Agarwal y Allamaneni, 2004; Evenson y col., 1999) como en otros mamíferos (Rybar y col., 2004; Waterhouse y col., 2006). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que se origina la fragmentación del ADN en los espermatozoides no se conoce, aunque la apoptosis, el estrés oxidativo o la permanencia de las roturas de ADN producidas durante el proceso de protaminación en la espermiogénesis se han propuesto como causas directas. Se sabe también que otros factores como la exposición a contaminantes ambientales (Rubes y col., 2005), el consumo de tabaco (Saleh y col., 2002b), la temperatura elevada (Banks

y col., 2005; Evenson y col., 2000; Oliva y col., 2001) o la edad avanzada (Schmid y col., 2007) podrían provocar fragmentación de ADN en los espermatozoides.

Los agentes infecciosos deben interferir en los programas genéticos que controlan el desarrollo normal de los organismos con un claro efecto perjudicial en la salud del individuo. En términos reproductivos, se sabe que estos agentes pueden afectar al desarrollo embrionario y a las tasas de ovulación y fecundación (Givens, 2006; Givens y Waldrop, 2004). Las tasas de supervivencia perinatal también pueden verse afectadas por un episodio infeccioso o incluso como consecuencia de un programa de vacunación (Givens, 2006). Aunque las vacunas están compuestas por gérmenes o toxinas inactivadas o atenuadas, cuando se inyectan en animales vivos pueden producir efectos secundarios. Se ha comprobado que la vacunación puede afectar a varios parámetros seminales como la motilidad, la concentración o la tasa de producción de formas anormales (Singh y col., 2003b). El objetivo de este noveno estudio es analizar si la vacunación subcutánea de ovejas con Miloxan (*Clostridium perfringens* tipo C, D y *Clostridium oedematiens* tipo B) tiene algún efecto en la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado.

2.2.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales

Se cree desde hace años que la remodelación estructural de la cromatina del espermatozoide ayuda a proteger del daño al genoma nuclear de estas células (Bloch, 1969; Bloch, 1976). Durante la espermiogénesis de los mamíferos, el núcleo celular comienza un proceso de condensación progresiva que finaliza con el espermatozoide maduro. Esta condensación se debe a cambios en las proteínas nucleares que interaccionan con el ADN del espermatozoide, la mayor parte de las histonas son reemplazadas por proteínas mucho más básicas, las protaminas.

A pesar de efectuar una misma función, existe una gran diversidad de proteínas nucleares espermáticas, estas proteínas varían de especie en especie e incluso en diferentes poblaciones de una misma especie (Kasinsky, 1989). Los requisitos mínimos funcionales que ha de poseer una proteína espermática son basicidad (argininas o lisinas) para neutralizar

electrostáticamente las cargas negativas de los grupos fosfato de las cadenas de ADN y presencia de serinas para modular las interacciones electrostáticas de la proteína básica con el ácido nucleico. Las protaminas de todas las especies del grupo Eutheria estudiadas son ricas en residuos de cisteína que establecen puentes disulfuro entre ellos durante el tránsito por el epidídimo (Aoki y col., 2006; Ward y Coffey, 1991). Este enlace covalente estabiliza fuertemente los núcleos espermáticos de las especies de mamíferos del grupo Eutheria (Balhorn, 1982; Balhorn y col., 1991; Meistrich y col., 1976; Ward y Coffey, 1991). Sin embargo, las protaminas de los marsupiales tienen una estructura muy diferente, excepto en los *Planigale* (Retief y col., 1995b), carecen de residuos de cisteína y, por tanto, de enlaces disulfuro entre las fibras de cromatina (Balhorn, 1989; Bedford y Calvin, 1974b; Cummins, 1980). Se cree que los puentes disulfuro que se forman entre y dentro de las protaminas de los mamíferos del grupo Eutheria hacen al espermatozoide más resistente a varios agentes como ácidos, proteasas, ADNasas y detergentes (Cummins, 1980; Mahi y Yanagimachi, 1975). En este décimo estudio se quiere probar si la diferencia en la estructura de las protaminas entre los mamíferos del grupo Eutheria y Metatheria en relación a la presencia de residuos de cisteína confiere estabilidad y resistencia al espermatozoide y contribuye a proteger la cromatina espermática del daño oxidativo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación es desarrollar una técnica capaz de valorar la fragmentación del ADN de los espermatozoides de distintas especies de mamíferos. La técnica denominada Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides (SCD), inicialmente desarrollada para ser utilizada en espermatozoides humanos y basada en la descondensación diferencial de los núcleos espermáticos cuando se someten a una desnaturalización ácida suave y a una posterior lisis de membranas y protaminas, es utilizada como base para el desarrollo de modificaciones adaptadas a las características especie-específicas de los espermatozoides.

Además, con el propósito de poner de manifiesto su utilidad, se diseñaron una serie de estudios concretos para caracterizar no sólo la capacidad de la técnica para detectar el daño de ADN sino, también, para profundizar en el origen e importancia de la fragmentación del ADN de los espermatozoides. A continuación se detallan los objetivos concretos de este trabajo de investigación:

- Comprobar que el test SCD es una prueba rápida, fiable y reproducible para la evaluación de la fragmentación del ADN de los espermatozoides humanos.
- Probar la eficacia de los soportes informáticos de análisis de imagen *Leica Qwin Pro* y *Volocity* para clasificar espermatozoides procesados con el test SCD según el grado de fragmentación de ADN.
- Determinar, usando el test SCD, el patrón de daño de ADN espermático de hombres infértiles con varicocele y explorar el origen de la degradación del ADN espermático en estos pacientes.
- Desarrollar una versión del ensayo cometa para la evaluación simultánea de roturas de ADN de cadena sencilla y doble en el mismo espermatozoide.
- Correlacionar la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado obtenida mediante el test SCD y el ensayo cometa modificado con otros parámetros indicadores de la calidad seminal.
- Determinar la utilidad del índice de fragmentación, evaluado mediante el test SCD y el ensayo cometa modificado, en la predicción del embarazo en reproducción asistida.

- Estudiar la eficacia de los métodos de procesamiento de muestras seminales en la mejora de la integridad del ADN de una muestra y la influencia que éstos pueden tener en el resultado de las técnicas de reproducción asistida.
- Desarrollar un test SCD para ser utilizado en espermatozoides de distintas especies de mamíferos: cerdo, toro, ratón, caballo y oveja.
- Analizar la dinámica de la fragmentación del ADN en distintas condiciones de conservación.
- Examinar la relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.
- Explorar la relación entre el proceso de protaminación y la fragmentación del ADN del espermatozoide.
- Valorar la utilidad del índice de fragmentación de ADN espermático en la evaluación de la fertilidad.
- Analizar el efecto de la vacunación sobre la integridad del ADN de los espermatozoides.
- Comparar la resistencia al daño de ADN oxidativo de los espermatozoides de distintas especies de mamíferos.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 El Test la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos

Preparación de las muestras

Se trabajó con muestras de espermatozoides maduros de un donante sano, tras obtener el consentimiento informado.

Test SCD

Cada muestra de semen se diluyó a una concentración de 5-10 millones de espermatozoides/ml en medio RPMI (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), y se mezcló con agarosa líquida de bajo punto de fusión (Pronadisa, Madrid, España) atemperada a 37°C, de modo que la concentración final de la agarosa fuera del 0,7%. Sobre un portaobjetos de cristal previamente recubierto de una película de agarosa estándar (Pronadisa, Madrid, España) al 0,65%, se depositaron 15 µl de la suspensión de agarosa y espermatozoides, se cubrió con un cubreobjetos de 20x20 mm y se dejó solidificar a 4°C durante 5 minutos hasta formar un microgel. Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se introdujeron horizontalmente en una bandeja con solución ácida (Halospem, Halotech DNA SL, Madrid, España) durante 7 minutos a temperatura ambiente, para generar tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura del ADN. Posteriormente, los núcleos se sometieron a una solución de lisis (Halospem, Halotech DNA SL, Madrid, España) para extraer membranas y proteínas. Tras un lavado de 5 minutos en abundante agua destilada, las preparaciones se deshidrataron en baños de 70, 90 y 100% (v/v) de etanol de 2 minutos cada uno y el microgel se dejó secar al aire. Las preparaciones pueden ser analizadas inmediatamente o almacenarse durante varios meses en una caja cerrada a temperatura ambiente. Los resultados se pueden valorar de forma visual directa o mediante un sistema de análisis de imagen digital.

Tinción con Wright

Para su observación en microscopía de campo claro, las preparaciones se cubrieron horizontalmente con una mezcla de solución de Wright (Merck, Darmstadt, Alemania) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) (50% v/v) de 5 a 10 minutos con un continuo flujo de aire. A continuación, las preparaciones se lavaron con agua y se dejaron secar.

Tinción con DAPI y mercuridibromofluoresceína

Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con 10 µl de mercuridibromofluoresceína (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) a una concentración de 0,05 mg/ml, se cubrieron con un cubre de *parafilm* (American National Can, Baltimore, Maryland, Estados Unidos) durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se lavaron con agua y se dejaron secar. Una vez secas, las células se tiñeron con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Roche, Basel, Suiza) a una concentración de 2 µg/ml en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos). Para la observación de los núcleos exclusivamente, las preparaciones se tiñeron sólo con DAPI como se ha indicado antes.

DBD-FISH

Sobre muestras de espermatozoides incluidas en un microgel y procesadas con el protocolo del test SCD, se realizó una FISH con una sonda de ADN genómico humano (5 ng/ml en 50% de formamida/solución salina de citrato 2xSSC, sulfato de dextrano al 10% (p/v) y fosfato cálcico 0,1 M, pH 7.0) (1xSSC es citrato sódico 0,015 M y cloruro sódico 0,15 M, pH 7.0), marcada mediante *Nick Translation* (Nick Translation kit, Roche, Basel, Suiza). La sonda se desnaturalizó y se puso en contacto con las preparaciones durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces en 50% de formamida/2xSSC, pH 7, durante 5 minutos, y dos veces en 2xSSC, pH 7, durante 3 minutos a temperatura ambiente. La sonda se detectó con el anticuerpo correspondiente (Roche, Basel, Suiza) (5 µg/ml) y las células se contratiñeron con DAPI (Roche, Basel, Suiza) (2 µg/ml).

Estudio de la variabilidad inter e intraobservador

Para estimar la variabilidad intra e inter observador en el recuento de espermatozoides con ADN fragmentado, una alícuota de una muestra de semen congelado del mismo individuo se distribuyó a cuatro técnicos distintos y se procesó con el test SCD. Cada técnico analizó 500 células 3 veces al día en 2 días distintos. Se realizaron un total de 24 determinaciones. Se determinó la variabilidad interobservador comparando las medias de los niveles de fragmentación obtenidos por cada uno de los cuatro técnicos; y la variabilidad intraobservador, comparando los niveles de fragmentación obtenidos por el mismo técnico.

Captura de imágenes

Las imágenes de fluorescencia se tomaron en formato “.tif” con una cámara digital (Leica DFC 350 FX, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leitz DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes de campo claro se tomaron con una cámara Moticam 2000 asociada a un microscopio Motic BA300.

Análisis de imagen digital en dos dimensiones

Para el análisis de imagen digital en dos dimensiones, se fotografiaron 60 espermatozoides de cada tipo (no fragmentados, fragmentados y degradados) y se usó el programa informático *Leica Qwin Pro 3.2.0* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide. A partir de las imágenes grises originales, se constituyeron imágenes binarias o máscaras estableciendo unos rangos de valores de grises mediante el soporte informático *Leica Qwin Pro*. De manera que se detectaron las áreas de la imagen que se encontraban dentro de estos rangos de valores preestablecidos y sobre éstas, quedó dibujada una imagen binaria. El programa midió los valores que se encontraban en esta imagen binaria. Para cuantificar los valores de cada espermatozoide se seleccionó manualmente, de entre las detectadas, el área correspondiente a cada una de las células espermáticas, creando una nueva máscara. Entonces se midieron exclusivamente los valores de grises de la fracción de la imagen que quedó bajo la nueva máscara. En cada imagen binaria, se determinaron los siguientes parámetros: Área (μm^2)= superficie del objeto; Perímetro (μm)=

longitud total del límite del objeto; Redondez= un factor de forma que da el valor de unidad mínimo para los círculos se calcula a partir del perímetro al cuadrado por la superficie; Nivel de grises integrado= suma de los niveles de grises de los píxeles; Media de grises= media de los niveles de grises de los píxeles; Varianza de grises= varianza de los niveles de grises de los píxeles. Para el cálculo, los valores obtenidos se exportan al programa de cálculo *Microsoft Excell* (Microsoft).

Análisis de imágenes en tres dimensiones

Para el análisis de imagen digital en tres dimensiones, se fotografiaron 50 espermatozoides de cada tipo (halo grande, halo mediano, halo pequeño, sin halo y degradado) y se usó el programa informático *Volocity* (Improvision, Coventry, Inglaterra) para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide. La imagen gris original se transformó en una imagen binaria fijando un umbral de nivel de grises, de manera que, todos los vóxeles de la imagen que se ajustaban al umbral definido, fueron transferidos a la imagen binaria. Para cuantificar los valores de cada espermatozoide se seleccionó manualmente, de entre las detectadas, el área correspondiente a cada una de las células espermáticas creando una nueva máscara. Entonces se midieron exclusivamente los valores de grises de la fracción de la imagen que quedó bajo la nueva máscara. En cada imagen binaria se midieron los siguientes parámetros: Número de vóxeles= número de vóxeles del objeto; Volumen (μm^3)= volumen del objeto en μm^3 ; Media= intensidad media de los niveles de grises; Suma= suma de la intensidad de los niveles de grises; Centriode X= posición en el eje X del centriode del objeto; Centriode Y= posición en el eje Y del centriode del objeto; Centriode Z= posición en el eje Z del centriode del objeto; Área superficial (μm^2) = área total de los vóxeles superficiales en μm^2 . Para el cálculo, los valores obtenidos se exportan al programa de cálculo *Microsoft Excell* (Microsoft).

Cálculo de los índices de fragmentación y análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17)

El índice de fragmentación (DFI) es el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado de una muestra de semen. Para establecer el DFI de una muestra, se cuentan 500 espermatozoides por preparación. El índice de degradación (DDI) es el porcentaje de espermatozoides con el ADN degradado de una muestra de semen. Para establecer el DDI de una muestra, se cuentan 500 espermatozoides por preparación.

Para probar si existían diferencias significativas entre el DFI calculado por diferentes técnicos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$). Para valorar las diferencias entre los DFIs establecidos por el mismo técnico en 6 conteos diferentes, se usó un test X^2 , $\alpha=0,05$.

Para identificar las diferencias significativas en los parámetros medidos con el programa de análisis de imagen digital *Leica Qwin Pro* en los distintos tipos de espermatozoides analizados en dos dimensiones, se efectuó un análisis de Kruskal- Wallis ($\alpha=0,05$). El mismo análisis se utilizó para detectar si existían diferencias significativas en los parámetros medidos por el programa informático Volocity entre los distintos tipos de espermatozoides estudiados en tres dimensiones.

4.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele

Selección de los grupos de estudio

Se analizó el semen, tras obtener el consentimiento informado, de 192 hombres clasificados en cuatro grupos: un primer grupo de 18 pacientes infértiles con varicocele diagnosticado mediante ecografía Doppler del escroto, un segundo grupo de 51 pacientes infértiles normozoospermicos, un tercer grupo de 103 pacientes infértiles con parámetros seminales anormales y por último, un grupo de 20 hombres fértiles. Los hombres pertenecientes al segundo, tercer y cuarto grupo tenían un examen genital normal. El análisis del semen se realizó de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). Las muestras seminales con parámetros anormales son aquellas que tienen una concentración menor o igual a 20 millones de espermatozoides/ml y/o una motilidad menor del 50% y/o un porcentaje de formas normales menor o igual al 14%.

Efecto de la temperatura

Para determinar el efecto de la temperatura sobre el ADN de los espermatozoides humanos, 10 muestras de semen normozoospermicas, diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) se incubaron durante 7 días a 34 y 37°C. El índice de fragmentación de ADN de las muestras se analizó periódicamente a las 0, 3, y 6 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación.

Efecto del estrés oxidativo

Para determinar el efecto del estrés oxidativo sobre el ADN de los espermatozoides humanos, 10 muestras de semen normozoospermicas, diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) se incubaron a 34°C durante 7 días en concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0,003% y 0,03% v/v) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos). El índice de fragmentación de ADN de las muestras se analizó periódicamente a las 0, 12 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación.

Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

El análisis de las diferencias entre los DFIs de las poblaciones de sujetos fértiles, infértiles con parámetros seminales anormales, infértiles con parámetros seminales normales e infértiles con varicocele se realizó usando el test de U de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$).

Para comprobar si existían diferencias significativas en los DFIs y DDIs calculados en las muestras a 34 y 37°C se usó el test no paramétrico U de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$).

Además se utilizó el test de Breslow ($\alpha=0,05$) para probar las diferencias entre las curvas de supervivencia construidas a partir de los datos de fragmentación y degradación a 34 y 37°C.

Para comprobar si existían diferencias significativas en los DFIs y DDIs calculados en las muestras incubadas en concentraciones crecientes de H_2O_2 se usó el test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$). Además se utilizó el test de Breslow ($\alpha=0,05$) para probar las diferencias entre las curvas de supervivencia construidas a partir de los datos de fragmentación y degradación de los distintos tratamientos de estrés oxidativo.

4.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos

Preparación de las muestras

El estudio se realizó con leucocitos de sangre humana y espermatozoides maduros del mismo donante sano, tras obtener el consentimiento informado.

Para la extracción de los leucocitos se trabajó con muestras de sangre fresca humana. Las muestras se preservaron hasta su utilización en tubos con Heparina-Litio para evitar la coagulación. Se añadieron 500 μl de esta sangre a un tubo con 2 ml de Ficoll (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) muy despacio para que no se mezclara la sangre con el Ficoll. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos. Se recogió la fase de leucocitos, se añadieron 10 ml de tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 6 ml de tampón fosfato, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y finalmente el *pellet* se resuspendió en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Ensayo cometa en dos dimensiones (2D)

Se trabajó con muestras de espermatozoides y leucocitos. Las muestras diluidas a una concentración de 5-10 millones de espermatozoides/ml en medio RPMI (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), se mezclaron con agarosa líquida de bajo punto de fusión (Pronadisa, Madrid, España) atemperada a 37°C , de tal modo que la concentración final de la agarosa fuera del 0,7%. Sobre un portaobjetos previamente recubierto de una película de agarosa estándar (Pronadisa, Madrid, España) al 0,65%, se depositaron 15 μl de esta suspensión, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4°C durante 5 minutos. Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se introdujeron horizontalmente en

dos soluciones: la primera (Tris-HCl 0,4 M, DTT 0,8 M, SDS 1% (p/v), pH 7.5) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida de la segunda (Tris-HCl 0,4 M, NaCl 2 M, SDS 1% (p/v), EDTA 0,05 M, pH 7.5) durante 30 minutos también a temperatura ambiente. Tras lavar las preparaciones en solución tampón TBE (Tris-Borato 0,09 M, EDTA 0,002 M, pH 7.5) durante 10 minutos, se transfirieron a una cubeta electroforesis con solución tampón TBE recién preparada. A continuación, las preparaciones se sometieron a una electroforesis de 20 V ($1\text{V}/\text{cm}^2$) durante 12 minutos, se lavaron en NaCl al 0.9% (p/v), y se sumergieron en una solución alcalina (NaOH 0,03 M, NaCl 1 M) durante 2,5 minutos. Posteriormente, se transfirieron a una cubeta de electroforesis con una solución de NaOH 0,03 M orientando los portaobjetos de manera perpendicular a la primera electroforesis. Esta segunda electroforesis se realizó a 20 V ($1\text{V}/\text{cm}^2$) durante 4 minutos. Finalmente, las preparaciones se lavaron en una solución neutralizante (Tris-HCl 0,4 M, pH 7.5) durante 5 minutos, se aclararon en TBE, se deshidrataron en baños de etanol al 70, 90 y 100% (v/v) de 2 minutos cada uno y se dejaron secar al aire. Las muestras pueden ser analizadas inmediatamente o almacenadas a temperatura ambiente.

Para su observación en microscopía de fluorescencia los cometas se tiñeron con SYBR Green I (Molecular Probes Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) (1:10.000 v/v en tampón TBE). Los resultados se pueden valorar por conteo visual directo o mediante un sistema de análisis de imagen digital.

Inducción de roturas de cadena sencilla

Para inducir daño de cadena sencilla en el ADN de los espermatozoides, se utilizó H_2O_2 (Yamamoto, 1969). Las muestras de espermatozoides, diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) se incubaron en H_2O_2 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) al 0,03%, 0,15% y 0,3% v/v durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Inducción de roturas de cadena doble

Para inducir daño de cadena doble en el ADN de los espermatozoides, se usó la enzima de restricción Alu I (Roche, Basel, Suiza). Esta enzima reconoce la secuencia AG/CT y genera

fragmentos de ADN con extremos romos (Roberts, 1976; Brooks, 1987). Después de la hora de lisis del protocolo del ensayo cometa 2D anteriormente descrito, las preparaciones se lavaron con solución tampón TBE durante 20 minutos y se incubaron durante 10 minutos en exceso del tampón de reacción de la enzima (Roche, Basel, Suiza) (50 µl por preparación). Posteriormente se añadieron a la preparación 15 µl de solución de reacción con 15 unidades de enzima, se cubrió con un cubreobjetos de *parafilm* (American National Can, Baltimore, Maryland, Estados Unidos), y se incubó en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 15 y 25 minutos. A continuación, las preparaciones se lavaron en TBE durante 10 minutos, se colocaron en la cubeta de electroforesis y se continuó el protocolo del ensayo cometa 2D.

Detección de ADN de cadena sencilla mediante FISH

Sobre muestras de espermatozoides incluidas en un microgel y sometidas al ensayo cometa 2D, se realizó una FISH con una sonda de ADN genómico humano (5 ng/ml en 50% de formamida/solución salina de citrato 2xSSC, sulfato de dextrano al 10% (p/v) y fosfato cálcico 0,1M, pH 7.0) (1XSSC es citrato sódico 0,015 M y cloruro sódico 0,15M, pH 7.0) marcada mediante *Nick Translation* (Nick Translation kit, Roche, Basel, Suiza). La sonda se desnaturalizó y se puso en contacto con las preparaciones durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces en 50% (v/v) de formamida/2xSSC, pH 7, durante 5 minutos y dos veces en 2xSSC pH 7 durante 3 minutos a temperatura ambiente. La sonda hibridada se detectó con el anticuerpo correspondiente (Roche, Basel, Suiza) (5 µg/ml) y los cometas se contratiñeron con yoduro de propidio (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) (2,5 µg/ml).

Tinción con naranja de acridina

Sobre la preparación procesada con el protocolo del ensayo cometa 2D se depositaron 15 µl de naranja de acridina (Polysciences, Warrington, Filadelfia, Estados Unidos) ($0,5 \times 10^{-4}$ M), se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se evaluó inmediatamente en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 450–490 nm.

Estudio de la variabilidad inter e intra ensayo

Para estimar la variabilidad inter ensayo del índice fragmentación de ADN de los espermatozoides, la misma muestra humana normozoospermica se valoró en 5 ensayos diferentes (A, B, C, D, E). La variabilidad intra ensayo se determinó mediante la evaluación de la misma muestra 5 veces en un mismo ensayo (A1, A2, A3, A4, A5).

Captura de imágenes

Las imágenes de fluorescencia se tomaron en formato “.tif” con una cámara digital (Leica DFC 350 FX, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leitz DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Análisis de imagen digital

A partir de las imágenes grises originales, se constituyeron imágenes binarias o máscaras mediante el establecimiento unos rangos de valores de grises mediante el soporte informático *Leica Qwin Pro 3.2.0* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). De manera que se detectaron las áreas de la imagen que se encontraban dentro de estos rangos de valores preestablecidos y sobre éstas, quedó dibujada una imagen binaria. El programa midió los valores que se encontraban en esta imagen binaria. Para cuantificar los valores de cada espermatozoide se seleccionó manualmente, de entre las detectadas, el área correspondiente a cada una de las células espermáticas creando una nueva máscara. Entonces se midieron exclusivamente los valores de grises de la fracción de la imagen que quedó bajo la nueva máscara. En cada imagen binaria, se determinaron los siguientes parámetros: Píxeles = número de píxeles medidos; Suma de Grises = suma de los niveles de grises de los píxeles ; Media de Grises = media de los niveles de grises de los píxeles; Desviación Estándar = desviación estándar de los niveles de grises de los píxeles; Máximo de Grises = máximo nivel de grises de los píxeles; Mínimo de Grises = mínimo nivel de grises de los píxeles; Mediana = mediana del nivel de grises de los píxeles; Moda = moda del nivel de grises de los píxeles. Para el cálculo, los valores obtenidos se exportaron al programa de cálculo *Microsoft Excell* (Microsoft). Se consideró innecesario medir todos los tipos de cometa puesto que algunos tipos requerían los mismos criterios de medición.

Cálculo de los índices de fragmentación y análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

El índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) es el porcentaje de espermatozoides con roturas de ADN de cadena sencilla de una muestra de semen. El índice de fragmentación de ADN de cadena doble (DFI ds) es el porcentaje de espermatozoides con roturas de ADN de cadena doble de una muestra de semen. Para establecer los índices de fragmentación de ADN se cuentan 500 espermatozoides por preparación.

Para demostrar la existencia de diferencias significativas en el DFI entre el control, las preparaciones tratadas con H₂O₂ y las digeridas con Alu I, se realizó un test X² ($\alpha=0,05$). Este mismo test se usó para probar la reproducibilidad del ensayo cometa 2D. Un análisis de los residuos tipificados corregidos ($\alpha=0,05$) permitió identificar los tipos de cometas responsables de las diferencias significativas.

Un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) y un análisis de comparación múltiple post hoc (método de Bonferroni) ($\alpha=0,05$) se efectuó para identificar las diferencias significativas en los parámetros medidos con el *Leica Qwin Pro* en los distintos tipos de cometa 2D.

4.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida

Selección de los pacientes y preparación de las muestras

Las muestras seminales procedían de pacientes que seguían ciclos de Inseminación Artificial Intrauterina (IUI) en el Hospital Quirón de Madrid. Se recogieron 143 muestras de 79 pacientes entre enero de 2008 y mayo de 2009. Para este estudio, se aceptaron las muestras que presentaban una concentración de más de 5 millones de espermatozoides/ml y ausencia de celularidad. Las muestras fueron recogidas tras una abstinencia sexual de 3-5 días. Los parámetros seminales volumen, concentración y motilidad se evaluaron inmediatamente en las muestras de semen fresco. Para la determinación del índice de fragmentación del ADN de las

muestras, 50 µl de cada una se congeló a -20°C para su posterior análisis. Todas las muestras analizadas se emplearon en la IUI realizada.

Para la segunda parte del estudio, se obtuvieron muestras seminales de varones de parejas que seguían tratamientos de infertilidad mediante las técnicas de Fecundación *in vitro* (FIV) o Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Se recogieron un total de 47 muestras de 20 varones que fueron analizadas entre enero 2008 y mayo de 2009. Los parámetros seminales volumen, concentración y motilidad se evaluaron inmediatamente en las muestras de semen fresco. Para la determinación del índice de fragmentación del ADN de las muestras, 50µl de cada una se congeló a -20°C para su posterior análisis. Ninguna de las muestras analizadas se utilizó en la técnica de reproducción asistida empleada (FIV, ICSI o ambas), los valores de los parámetros seminales determinados en estas muestras se utilizaron para calcular medias que caracterizaran las muestras seminales de cada paciente. El rango de edad de los pacientes osciló entre los 28 y 42 años, con una media (error ± estándar) de 34,92 ± 0,525 en las mujeres y de 35,83 ± 0,564 en los hombres.

Seminograma habitual : volumen, concentración y motilidad.

Tras la licuefacción del semen a 37°C, 5% CO₂ durante 10 minutos, se examinaron el volumen, la concentración y motilidad de acuerdo con los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999).

Recuperación mediante swim up

La muestra de semen puro se diluyó al 50% (v/v) con medio para espermatozoides IVF plus (Vitrolife, Göteborg, Suecia) gaseado y caliente. Se centrifugó a 1400 rpm durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadieron cuidadosamente 400 µl de medio fresco y se incubó durante 1 hora a 37°C con una inclinación de los tubos de 45°. Tras este período, se recuperaron de 0,1-0,5 ml de la parte superior. Se recogieron alícuotas (50 µl) de cada muestra seminal antes y después de la recuperación y se congelaron a -20°C para procesarlas posteriormente mediante el test SCD y el ensayo cometa 2D.

Recuperación mediante centrifugación en gradiente de densidad

En un tubo cónico de centrifuga ligeramente inclinado se depositaron con sumo cuidado 500 µl de cada una de las capas del gradiente, Spermgrad (Vitrolife, Goteborg, Suecia) diluido con IVF Plus (Vitrolife, Goteborg, Suecia), primero la de mayor densidad (90%) y luego la de menor densidad (50%), evitando que se mezclen. A continuación, sobre el gradiente formado, se aplicó toda la muestra de semen y se centrifugó a 1200 rpm durante 20 minutos. Se retiró la capa superior y las 2/3 partes de la capa de abajo, y el resto se resuspendió en 1 ml de medio para espermatozoides IVF plus (Vitrolife, Goteborg, Suecia). A partir de este momento el procesamiento es igual que el protocolo detallado anteriormente para la recuperación mediante *swim up*. Se recogieron alícuotas (50 µl) de cada muestra seminal antes y después de la recuperación y se congelaron a -20°C para procesarlas posteriormente mediante el test SCD y el ensayo cometa 2D.

Estimulación ovárica en los ciclos de Reproducción Asistida

La estimulación ovárica en tratamientos de Reproducción Asistida consigue el reclutamiento y estimulación simultánea de varios ovocitos con el fin de aumentar el número de embriones conseguidos, y por tanto, la posibilidad de embarazo en un ciclo de FIV. Para ello, además de la estimulación ovárica, se realiza el bloqueo de la acción de las hormonas liberadas, de manera natural, por la hipófisis (supresión hipofisaria). De este modo se puede controlar el momento de la ovulación, para realizar IUI, o el momento en el que los ovocitos pueden ser captados del folículo ovárico, para ciclos de FIV o ICSI.

En el caso de los ciclos de IUI, las pacientes fueron sometidas a ciclos de estimulación suave con FSH recombinante (rFSH, Gonal-F, Merck-Serono SA, Darmstadt, Alemania o Puregon, Organon Española, Barcelona, España) o HMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) (Lepori, Laboratorios Farma, Barcelona, España o Menopur, Ferring, Madrid, España). La estimulación ovárica se comenzó en el tercer día de ciclo con una dosis de 75-150 UI de rFSH diarias. La maduración de los folículos se monitorizó mediante control ecográfico transvaginal y niveles de estradiol en suero. Cuando el diámetro del folículo de mayor tamaño alcanzó 17 mm, las pacientes recibieron 10 000 UI de hCG (Gonadotropina Coriónica Humana)

(Lepori, Laboratorios Farma, Barcelona, España) para inducir la ovulación y 36 horas después de la administración, se realizó la IUI bajo control ecográfico. Se administraron 200 mg de progesterona vía vaginal diariamente durante la fase lútea. Catorce días tras la inseminación, se realizó una valoración de β -HCG en orina para determinar embarazo bioquímico. Se considera embarazo clínico la visualización con ecografía transvaginal de uno o más sacos gestacionales.

En el caso de los ciclos de FIV o ICSI, la estimulación ovárica se realizó siguiendo los protocolos con agonistas o antagonistas de la GnRH para la supresión hipofisiaria. Las pacientes empezaron con una administración entre 0,05 y 0,1 mg de triptorelina (Decapeptyl, Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, Francia) en la mitad de la fase lútea del ciclo previo, hasta que se confirmara el correcto frenaje del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, valorado mediante ecografía transvaginal y analítica hormonal. Se disminuyó la dosis de análogo de la GnRH a 0,05 mg hasta el día de la administración de la hCG. En el caso de que la supresión hipofisiaria se realizase con la administración de antagonistas de la GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropina), se comenzó la estimulación en el día 3 de ciclo con FSH, y se añadió 0,25 mg de antagonista de la GnRH (Cetrotide, Cetorelix, Merck-Serono SA, Darmstadt, Alemania; Orgalutran, Ganirelix, Organon Española, Barcelona, España) cuando el diámetro del folículo de mayor tamaño alcanzó 14 mm y/o los niveles de estradiol sérico superaron 400 pg/ml, manteniendo dicha pauta diariamente hasta el día de la administración de la hCG.

Independientemente de la administración de agonistas o antagonistas, para la estimulación ovárica se utilizaron FSH y hMG. Las dosis iniciales se determinaron según la edad de la paciente y los niveles basales de FSH y estradiol (E2) en suero. En el día de estimulación 5, se midió el nivel de E2 en suero y se ajustó la dosis de gonadotropinas según el protocolo de dosis crecientes o decrecientes. Cuando tres o más folículos alcanzaban los 18 mm de diámetro, se administró 10000 UI de hCG (Lepori, Laboratorios Farma, Barcelona, España) y la recogida de ovocitos mediante punción folicular se realizó 36 horas después.

Inseminación artificial intrauterina

Al hacer la IUI se insertó un catéter fino de material sintético flexible en la vagina de la paciente y, con una jeringa conteniendo la muestra de espermatozoides debidamente procesada,

se depositaron los espermatozoides en la cavidad uterina. La inyección de semen se realizó lentamente para evitar la distensión del útero y que se produjeran contracciones que pudieran expulsarlo a la vagina. Una vez depositados los espermatozoides se retiró el catéter y el espéculo.

Fecundación in vitro

Los ovocitos recuperados y los espermatozoides preparados para la fecundación se incuban juntos en una proporción de aproximadamente 100.000 : 1 en IVF Plus (Vitrolife, Goteborg, Suecia) durante 18-20 horas.

Inyección intracitoplasmática

La Inyección Intracitoplásmica de espermatozoides consiste en la introducción de un espermatozoide morfológicamente normal, previamente inmovilizado con una pipeta de microinyección, en el citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de metafase II) atravesando la zona pelúcida del ovocito. Los ovocitos microinyectados se incubaron en gotas de G1 Plus (Vitrolife, Goteborg, Suecia) (30 µl) y tras 18 horas se comprobó si había fecundación.

Determinación de la fecundación de los ovocitos

La fecundación se determinó a las 18-20 horas post-FIV/ICSI de acuerdo con la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

La morfología pronuclear del cigoto se observó a 20x en un microscopio invertido. Se evaluó la simetría de los pronúcleos, estableciéndose dos grupos: grupo A, aquellos cigotos con los pronúcleos de tamaño igual o muy similar; y grupo B, aquellos cigotos con pronúcleos de diferente tamaño. En cada grupo, los cigotos se subdividieron en cuatro categorías de acuerdo a la clasificación de Tesarik y Greco (1999). También se evaluó la presencia de halo citoplásmico, clasificando los cigotos como halo-positivos cuando mostraban la condensación perinuclear del citoplasma, y halo-negativos cuando no existía esta polarización del citoplasma.

Determinación de la morfología y la calidad embrionaria

La división se valoró 24 horas después de la fecundación. La morfología embrionaria se determinó en los días 2 y 3 de vida embrionaria, según el criterio de clasificación de ASEBIR (Cortés y col., 2008). Los embriones se transfirieron a la cavidad uterina 48-72 o 120-144 horas tras la FIV/ICSI dependiendo de las características del ciclo de cada paciente. Los embriones que no fueron transferidos y eran de buena calidad, se congelaron para posibles transferencias futuras. El embarazo clínico se determinó observando el saco gestacional con latido fetal a las 7 semanas del embarazo.

Análisis de la fragmentación del ADN: test SCD y ensayo cometa 2D

Se recogieron alícuotas (50 μ l) de muestras de semen puro y recuperado y se congelaron a -20°C. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se procesaron con el protocolo del test SCD y mediante el ensayo cometa 2D según lo descrito anteriormente en las páginas 61 y 67 respectivamente.

Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

Para comprobar que existían diferencias en los parámetros del seminograma habitual y en los índices de fragmentación de ADN calculados entre las muestras de semen puro y recuperado, se usó un test no paramétrico de U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$). Este mismo test sirvió para valorar las diferencias, en los parámetros seminales estudiados, entre muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. Se usó el coeficiente Rho de Spearman ($\alpha=0,05$) para establecer correlaciones entre los distintos parámetros indicadores de la calidad seminal analizados. Además, se realizaron unos análisis de regresión lineal ($\alpha=0,05$) entre los índices de fragmentación y degradación calculados. Finalmente, para identificar las diferencias significativas existentes en los parámetros seminales estudiados entre las muestras seminales que habían tenido éxito de embarazo y las que no, se realizó un test no paramétrico de U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$), tanto en las muestras utilizadas en las IUI como en las FIV/ICSI.

4.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN

Preparación de las muestras

Se trabajó con muestras de espermatozoides humanos y porcinos.

Se utilizaron muestras de espermatozoides maduros humanos procedentes de un donante sano, tras obtener el consentimiento informado.

Se utilizó semen fresco de 36 sementales porcinos adultos de las razas Duroc, Ibérica y Landrace/Large White con edades comprendidas entre 18 y 24 meses, alojados en corrales cubiertos en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de Madrid, alimentados una vez al día con alimento balanceado y acceso al agua *ad-libitum*. Las muestras se obtuvieron mediante la técnica de la *mano enguantada*, descartando la primera porción del eyaculado y filtrando la fracción de gel con una gasa estéril.

Test SCD desarrollado para espermatozoides humanos (Halosperm)

Una muestra de espermatozoides humanos y otra de espermatozoides porcinos se procesaron según lo descrito anteriormente en la página 61.

Test SCD desarrollado para espermatozoides de cerdo (Sperm-Sus-Halomax)

Se trabajó con una muestra de semen humano y 36 muestras de semen porcino pertenecientes a 36 individuos distintos, 10 de ellas se usaron para comparar el índice de fragmentación obtenido con esta técnica con el obtenido mediante el ensayo de ISNT. Cada muestra de semen se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en medio Acromax (GVP SL, Madrid, España) o tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) y se mezcló con agarosa líquida de bajo punto de fusión (Pronadisa, Madrid, España) atemperada a 37° C, de modo que la concentración final de la agarosa fuera del 0,7%. Sobre un portaobjetos de cristal previamente recubierto de una película de agarosa estándar (Pronadisa, Madrid, España) al 0,65%, se depositaron 15 µl de la suspensión de agarosa y espermatozoides, se

cubrió con un cubreobjetos de 20x20 mm y se dejó solidificar a 4°C durante 5 minutos hasta formar un microgel. Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se introdujeron horizontalmente en una bandeja con solución de lisis (Sperm-*Sus*-Halomax, Chromacell SL, Madrid, España) durante 5 minutos a temperatura ambiente para extraer membranas y proteínas. Tras un lavado de 5 minutos en abundante agua destilada, las preparaciones se deshidrataron en baños de etanol al 70, 90 y 100% (v/v) de 2 minutos cada uno y se dejaron secar al aire. Las preparaciones pueden ser analizadas inmediatamente o almacenarse durante varios meses en una caja cerrada a temperatura ambiente.

Para el análisis, los espermatozoides se contratiñeron con mercuridibromo fluoresceína (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) y yoduro de propidio (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) (2,5 µg/ml) en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) para su observación en microscopía de fluorescencia según lo descrito anteriormente (ver página 62) o con solución de Wright (Merck, Darmstadt, Alemania) para microscopía de campo claro según lo descrito anteriormente (ver página 62).

DBD-FISH

Se trabajó con 10 muestras de semen porcino pertenecientes a 10 individuos distintos. Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en la página 62.

In situ Nick Translation

Este ensayo se realizó sobre 10 muestras de semen porcino pertenecientes a 10 individuos distintos previamente incluidas en un microgel y procesadas recientemente con el protocolo del test SCD modificado (Sperm-*Sus*-Halomax, Chromacell SL, Madrid, España). Las preparaciones se lavaron cuatro veces en abundante tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 5 minutos cada lavado y se incubaron en una cámara húmeda en exceso de tampón de reacción de la ADN polimerasa I (Roche, Basel, Suiza) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a la preparación 50 µl de mezcla de reacción que contenía nucleótidos (dNTPs) (10 µM), digoxigenina 16-dUTP (10 mM), 5 U de ADN Polimerasa I y el tampón de enzima correspondiente, se cubrió con un cubre de vidrio y se

incubó en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 y 45 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados a la reacción, las preparaciones se lavaron 5 minutos en TCA al 5% (p/v) a 4°C y 2 minutos en agitación en Solución I (Tris base 1 M, NaCl 1 M, MgCl₂ 0,04M, Triton X-100 0,5% v/v) a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron en BSA al 2% (p/v) (100 µl) en una cámara húmeda durante 20 minutos a 42°C y se lavaron en agitación en Solución I durante 10 minutos a temperatura ambiente. La digoxigenina incorporada se detectó mediante la incubación con 30 µl del anticuerpo correspondiente (5 µg/ml) en una cámara húmeda durante 25 minutos a 37°C. Finalmente, las preparaciones se lavaron en 4T (Tween 20 0,1% (v/v), 4XSSC; pH 7) 3 veces 2 minutos cada una. Los núcleos espermáticos se contratiñeron con yoduro de propidio (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) (2 µg/ml).

Captura de imágenes

Las imágenes de fluorescencia se tomaron en formato “.tif” con una cámara digital (Leica DFC 350 FX, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leitz DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Análisis de imagen digital

Para el análisis de imagen digital, se trabajó con 4 muestras de semen pertenecientes a 4 individuos distintos. Tras fotografiar 30 espermatozoides por muestra (n=120), se usó el programa informático *Leica Qwin Pro 3.2.0* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) para tomar medidas cuantitativas de cada tipo de espermatozoide.

A partir de las imágenes grises originales, se constituyeron imágenes binarias o máscaras mediante el establecimiento de unos rangos de valores de grises con el soporte informático *Leica Qwin Pro*. De manera que se detectaron las áreas de la imagen que se encontraban dentro de estos rangos de valores preestablecidos y sobre éstas, quedó dibujada una imagen binaria. El programa midió los valores que se encontraban en esta imagen binaria. Para cuantificar los valores de cada espermatozoide se seleccionó manualmente, de entre las detectadas, el área correspondiente a cada una de las células espermáticas creando una nueva

máscara. Entonces se midieron exclusivamente los valores de grises de la fracción de la imagen que quedó bajo la nueva máscara. En cada imagen binaria, se determinaron los siguientes parámetros: Píxeles = número de píxeles medidos; Suma de Grises = suma de los niveles de grises de los píxeles; Media de Grises = media de los niveles de grises de los píxeles. Para el cálculo, los valores obtenidos se exportaron al programa de cálculo *Microsoft Excell* (Microsoft).

Análisis de los parámetros seminales: motilidad, estado del acrosoma e integridad de la membrana plasmática.

La motilidad se evaluó sobre un portaobjetos precalentado a 37°C usando un microscopio de contraste de fases con un objetivo 20x. Se contaron 100 espermatozoides por muestra.

El estado del acrosoma se valoró en muestras de semen fijadas en glutaraldehído al 2% (v/v) usando un microscopio de contraste de fases con un objetivo 100x (Pursel y Johnson, 1974). Se consideraron espermatozoides con el acrosoma intacto, aquellos con el borde apical normal y espermatozoides con el acrosoma dañado aquellos con el borde apical modificado, sin borde apical o sin acrosoma. Se contaron 100 espermatozoides por muestra y se calculó el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto.

La integridad de la membrana se valoró mediante un test de endósmosis celular (HOST) (Drevius y Eriksson, 1966; Jeyendran y col., 1984). Este test se fundamenta en las modificaciones producidas en la cola cuando los espermatozoides se incuban en un medio hipoosmótico durante un breve período de tiempo. Si la membrana plasmática está intacta, el espermatozoide presenta torsión helicoidal de la cola, estos espermatozoides con la cola enrollada se consideran HOST positivos; si, por el contrario, la membrana está dañada, los espermatozoides no presentan la cola enrollada y se consideran HOST negativos. El porcentaje de células HOST positivas se calculó poniendo 0,1 ml de la muestra en fresco en 1 ml de solución hiposmótica (75 mOsm/kg) en un baño a 37°C durante 5 minutos. Tras la incubación, 0,35 ml de la muestra se fijaron en 0,5 ml de glutaraldehído 2% (v/v) y se evaluaron en el microscopio de contraste de fases usando un objetivo 100x. Para valorar la muestra se contaron 100 espermatozoides por eyaculado.

Efecto de la temperatura y de los diluyentes

Para evaluar el efecto de la temperatura y los diluyentes en la integridad del ADN de los espermatozoides de cerdo, 6 muestras de semen seleccionadas, con un índice de fragmentación inferior al 5% y parámetros seminales normales (Hafez y Hafez, 2000), se incubaron durante 12 días a 15 y 37°C en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) y Acromax (GVP SL, Madrid, España). A partir de cada eyaculado se prepararon cuatro alícuotas (5 ml) de 10 millones de espermatozoides/ml cada una, dos de ellas usando como diluyente el medio de conservación de espermatozoides Acromax (GVP SL, Madrid, España), y las otras dos usando como diluyente tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania). Las dos alícuotas de cada tipo de diluyente preparadas se incubaron a 15 y 37°C durante 12 días. La motilidad, el estado del acrosoma, la integridad de la membrana plasmática y la fragmentación del ADN se analizaron a los 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días de incubación.

Tratamiento con ADNasa I y EDTA

Para estudiar si la fragmentación del ADN en espermatozoides de cerdo era debida a la actividad de nucleasas espermáticas, una alícuota (200 µl) de cada una de las 6 muestras de semen seleccionadas diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) se incubaron en presencia y ausencia de ADNasa I (Roche, Basel, Suiza) (1 µg/ml), a 15 y 37°C, durante 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días.

Además, otras 6 alícuotas (200 µl) de cada una de las 6 muestras de semen seleccionadas diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml se incubaron en presencia y ausencia de EDTA (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) (10 Mm) a 15 y 37°C, durante 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días.

También se valoró el efecto combinado de la adición de ADNasa y EDTA, en un experimento en el que una alícuota (200 µl) de cada una de las mismas 6 muestras de semen seleccionadas diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml se incubaron en presencia de ADNasa (Roche, Basel, Suiza) (1 µg/ml) y presencia y ausencia de EDTA (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) (10 Mm) a 15 y 37°C.

Al final de todas las incubaciones la actividad enzimática se paró añadiendo EDTA 50 mM.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17)

Para valorar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD, el ensayo DBD-FISH y el ensayo de ISNT, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) y un análisis de comparación múltiple post hoc (método de Bonferroni) ($\alpha=0,05$). Un análisis de Tuckey ($\alpha=0,05$) permitió establecer tres grupos diferentes de individuos con respecto al índice de fragmentación de ADN.

Para demostrar si los valores de los parámetros medidos con el programa de análisis de imagen *Leica Qwin Pro* en cada tipo de espermatozoide presentaban diferencias significativas, se realizó un test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$). Este mismo test se utilizó para comprobar si existían diferencias significativas en los índices de fragmentación de ADN de las muestras incubadas en los distintos diluyentes, tanto a 15 como a 37°C; y también para valorar si existían diferencias significativas en el índice de fragmentación de ADN entre las muestras incubadas en presencia y ausencia de ADNasa I y en presencia y ausencia de EDTA a 15 y 37°C. Se usó el coeficiente Rho de Spearman ($\alpha=0,05$) para establecer correlaciones entre los distintos parámetros indicadores de la calidad seminal analizados.

4.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN

Preparación de las muestras

Se trabajó con 17 muestras de semen descongelado pertenecientes a 17 toros Holstein-Friesian sanos y sexualmente maduros de un centro de inseminación artificial de Buenos Aires (Argentina). Todas las muestras se recogieron con una vagina artificial y se diluyeron inmediatamente en el diluyente TEST preparado como se describe en Graham y col., 1972 con

glicerol al 7% (v/v) a 37°C. El semen diluido se mantuvo a 5°C durante 2 horas y a continuación se congeló en pajuelas de 5 ml de polivinilo (IMV Eagle, L'Aigle, Francia). Estas pajuelas se congelaron sobre vapores de nitrógeno líquido y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para el análisis, las pajuelas se descongelaron en un baño térmico a 37°C durante 30 segundos.

Test SCD

Las muestras se procesaron usando una variante específica del test SCD desarrollada para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de toro, Sperm-Bos-Halomax (ChromaCell SL, Madrid, España) según lo descrito anteriormente en las páginas 77 y 78. Para su observación en microscopía de campo claro, las preparaciones se tiñeron con solución de Wright (Merck, Darmstadt, Alemania) según lo descrito anteriormente en la página 62.

Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con mercuridibromofluoresceína y yoduro de propidio según lo descrito anteriormente en la página 62.

In situ Nick Translation

Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en las páginas 78 y 79.

Evaluación de la morfología espermática

Se colocó una gota de la muestra de semen diluida a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C.

Se dejó secar al aire durante 2 horas y se deshidrató en un lavado de etanol 96% (v/v) durante 5 minutos. Se dejó secar al aire otros 30 minutos, se rehidrató con agua destilada y se tiñó con eosina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) al 10% (p/v) durante 1 minuto. A continuación la preparación se lavó con agua destilada y se tiñó con azul de anilina (Fischer Scientific, Pittsburgh, Filadelfia, Estados Unidos) durante 5 minutos. Finalmente, se lavó con abundante agua destilada durante 2 minutos y se dejó secar al aire. La morfología también

se valoró en las preparaciones procesadas con el protocolo del test SCD y teñidas con mercuridibromofluoresceína y yoduro de propidio. Este sistema permitió analizar la morfología y la fragmentación de ADN en un mismo espermatozoide de manera simultánea.

En el toro, existen varios sistemas de clasificación de anomalías morfológicas. En este estudio las anomalías se clasificaron, según los criterios definidos por Blom (1973), en anomalías *major* y *minor*.

Análisis de los parámetros seminales: concentración, motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática, vitalidad e integridad acrosómica

La concentración de espermatozoides de cada muestra se determinó por recuento en una cámara de Neubauer previa dilución de la muestra seminal (1:100 v/v) en una solución de glutaraldehído al 2% (v/v). El porcentaje de espermatozoides vivos se estableció mediante una tinción a 37°C con eosina al 1% (p/v) en citrato de sodio 300 mOsm (Hafez, 1996). Se contaron 100 espermatozoides por muestra.

El estado del acrosoma se valoró en muestras de semen fijadas en glutaraldehído al 2% (v/v) usando un microscopio de contraste de fases con un objetivo 100x (Saacke y White, 1972). Se contaron 100 espermatozoides por muestra y se calculó el porcentaje de acrosomas normales.

Se utilizó un test de endósmosis modificado para evaluar la integridad de la membrana plasmática (Rivolta y col., 1995). El porcentaje de células HOST positivas se calculó poniendo 1 ml de la muestra de semen fresco junto con 1 ml de una solución de fructosa y citrato de sodio (150 mOsm) en un baño térmico a 37°C durante 30 minutos. Los espermatozoides con la cola enrollada se consideraron HOST positivos, los espermatozoides con la cola recta, se consideraron HOST negativos. Se contaron 100 espermatozoides por muestra.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

Para valorar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo de ISNT, se efectuó un test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$). Se usó el coeficiente Rho de Spearman ($\alpha=0,05$) para establecer correlaciones entre los distintos parámetros indicadores de la calidad seminal analizados.

Para estudiar la relación de la morfología con la fragmentación del ADN del espermatozoide se calcularon varios índices de anomalías morfológicas y de fragmentación de ADN: *Índice de fragmentación de ADN* (DFI) = porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado en el total de espermatozoides; Índice de anomalías morfológicas (IA) = porcentaje de espermatozoides anormales morfológicamente (i) en el total de espermatozoides, (ii) en el total de espermatozoides fragmentados y (iii) en el total de espermatozoides no fragmentados; *Índice de anomalías morfológicas menor* (IA menor) = porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas *menor* (i) en el total de espermatozoides, (ii) en el total de espermatozoides fragmentados y (iii) en el total de espermatozoides no fragmentados; *Índice de anomalías morfológicas mayor* (IA mayor) = porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas *mayor* (i) en el total de espermatozoides, (ii) en el total de espermatozoides fragmentados y (iii) en el total de espermatozoides no fragmentados. Todos estos índices se determinaron contando 500 espermatozoides por muestra.

Para evaluar las diferencias significativas en los índices de anomalías morfológicas analizados existentes entre los espermatozoides con el ADN fragmentado e intacto, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$).

4.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración del espermatozoide con la fragmentación del ADN

Preparación de las muestras

Se trabajó con 65 muestras de espermatozoides de ratón pertenecientes a 65 individuos adultos de una población heterogénea. Los animales se alimentaron con comida balanceada y agua *ad-libitum* y se mantuvieron a fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad en jaulas individuales. Los ratones fueron anestesiados con éter y sacrificados a las 8 semanas de

vida. Se les extrajo la cola del epidídimo (región *cauda*) y se homogeneizó en 0,2 ml de solución tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) atemperado a 37°C. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania). En 7 de los ratones se extrajo el epidídimo entero y se diseccionó en tres partes: *caput*, *corpus* y *cauda*. Cada una de estas partes se sumergió en 0,2 ml de tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) atemperado a 37°C durante 10 minutos y se homogeneizó. Cada una de las alícuotas se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Test SCD

Se trabajó con 65 muestras de espermatozoides de ratón pertenecientes a 65 individuos distintos, 20 de ellas se usaron para comparar el índice de fragmentación obtenido con esta técnica con el obtenido mediante ISNT. Las muestras se procesaron usando el test SCD modificado para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de ratón (Sperm-*Mus*-Halomax, ChromaCell SL, Madrid, España) según lo descrito anteriormente en las páginas 77 y 78. Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con mercuridibromofluoresceína y yoduro de propidio según lo descrito anteriormente en la página 62.

In situ Nick Translation

Se trabajó con 20 muestras de espermatozoides de ratón pertenecientes a 20 individuos distintos. Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en las páginas 78 y 79.

Evaluación de la maduración espermática

Tinción con azul de anilina

Se realizaron extendidos con 10 µl de una suspensión de espermatozoides diluidos en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania), se dejaron secar al aire y se fijaron con glutaraldehído al 3% (v/v) en tampón fosfato 0,2 M durante 30 minutos. Posteriormente las preparaciones se tiñeron con 1,5 ml de azul de anilina (AB) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) al 5% (p/v) en ácido acético al 4% (v/v) pH 3,5 durante 5 minutos a temperatura

ambiente (Auger y col., 1990). El azul de anilina se une específicamente a los residuos de lisina de las histonas, de manera que los espermatozoides inmaduros aparecen parcial o totalmente teñidos de azul (AB+) mientras que los espermatozoides maduros no están coloreados (AB-). Se estudiaron 200 espermatozoides en el microscopio óptico de campo claro y se calculó el porcentaje de espermatozoides inmaduros (%AB+).

Tinción con cromomicina A3 (CMA3)

Se realizaron extendidos con 10 μ l de una suspensión de espermatozoides diluidos en tampón fosfato y se fijaron con solución de Carnoy a 4°C (Metanol/acido acético glacial 3:1) durante 10 minutos. A continuación, se trató cada preparación con 100 μ l de solución de CMA3 (0,25 mg/ml de CMA3 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) en solución de McIlvaine, pH 7.0, que contiene ácido cítrico 7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.065 M y MgCl_2 10 mM) durante 20 minutos a temperatura ambiente (Bianchi y col., 1993). Las preparaciones se lavaron en solución de McIlvaine y finalmente, se montaron con una mezcla de glicerol en solución de McIlvaine 50% (v/v) (Johnson y Nogueira, 1981) para su observación en el microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides amarillo brillante se consideraron inmaduros (CMA3+), mientras que los espermatozoides amarillo-verdosos menos brillantes se consideraron maduros (CMA3-). Se estudiaron 200 espermatozoides y se calculó el porcentaje de espermatozoides inmaduros (%CMA3+).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

Para valorar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo de ISNT, se efectuó un test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$).

Para identificar diferencias significativas en los índices de fragmentación calculados en las distintas regiones del epidídimo se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) y un análisis de comparación múltiple post hoc (método de Bonferroni) ($\alpha=0,05$). Para comprobar si

existían diferencias significativas en los índices de maduración determinados en cada una de las regiones del epidídimo analizadas se usó la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

4.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.

Preparación de las muestras

Se trabajó con 19 muestras de semen de caballo pertenecientes a 19 individuos de distintas razas con edades comprendidas entre los 4 y 15 años donadas por el área de Teriogenología de la Universidad de Buenos Aires. Todas las muestras se recogieron con una vagina artificial, una parte se diluyó en diluyente de Kenney (Hamilton Research Inc., South Hamilton, Massachusetts, Estados Unidos) y otra se criopreservó en pajuelas de 0,5 ml siguiendo el procedimiento descrito por Cristaneli y col. en 1984. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido. Para su utilización, las muestras se descongelaron durante 7 segundos en un baño a 75°C y luego durante 5 segundos en un baño a 37°C.

Test SCD

Las muestras se procesaron usando el test SCD modificado para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de caballo (Sperm-*Equus*-Halomax, ChromaCell SL, Madrid, España) según lo descrito anteriormente en las páginas 77 y 78. Para su observación en microscopía de campo claro, las preparaciones se tiñeron con solución de Wright (Merck, Darmstadt, Alemania) según lo descrito anteriormente en la página 62.

Tinción con eosina y yoduro de propidio

Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con 10 μ l de eosina (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) a una concentración de 0,01mg/ml, se cubrieron con un cubre de *parafilm* (American National Can, Baltimore, Maryland, Estados Unidos) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua y se dejaron secar. Una vez secas, las células se tiñeron con yoduro de propidio (Invitrogen, Carlsbad, California,

Estados Unidos) a una concentración de 2,5 µg/ml (Roche, Basel, Suiza) en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos).

In situ Nick Translation

Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en las páginas 78 y 79.

Análisis de los parámetros seminales: motilidad, morfología normal e integridad de la membrana plasmática

La motilidad progresiva se examinó *de visu* en un microscopio de campo claro sobre un portaobjetos mantenido a 37°C. La concentración y el número total de espermatozoides se determinaron en una cámara de recuento celular de Neubauer. La morfología se evaluó en un portaobjetos fijado en solución salina formolada según lo descrito por Kenney y col. en 1983.

Para estimar el porcentaje de espermatozoides HOST positivos se incubaron 100 µl de semen fresco en 1 ml de lactosa (50 mOsm) durante 30 minutos a 37°C (Neild y col., 1999). Se contaron 100 espermatozoides por eyaculado y se estableció el porcentaje de espermatozoides con la cola enrollada.

Cálculo de la tasa de preñez y del número de servicios por preñez

La tasa de preñez se definió como el porcentaje de inseminaciones que habían conseguido un embarazo. El número de servicios por preñez se estimó como el número de servicios utilizados en un número de yeguas determinado dividido por el número de yeguas preñadas después de 40 días.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

Para valorar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo de ISNT, se efectuó un test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$). Este mismo análisis se utilizó para comprobar si existían diferencias en el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal entre las muestras frescas y descongeladas. Para identificar diferencias significativas en la motilidad y la integridad de la membrana plasmática entre las muestras frescas y descongeladas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$). Se usó el coeficiente Rho de Spearman ($\alpha=0,05$) para establecer correlaciones entre los distintos parámetros indicadores de la calidad seminal analizados, la tasa de embarazo y el número de servicios por embarazo.

Se usó el test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$) para evaluar las diferencias significativas existentes en la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, el índice de fragmentación y el número de servicios por embarazo entre el grupo de caballos con fertilidad alta y el de caballos con fertilidad baja. Para evaluar las diferencias significativas existentes en el número total de espermatozoides, la morfología y la tasa de embarazo, entre el grupo de caballos con fertilidad alta y el de caballos con fertilidad baja, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$).

4.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN

Selección de los grupos de estudio

Se trabajó con 113 muestras de semen de oveja pertenecientes a distintos individuos de 4 razas distintas (Castellana, Assaf, Lacaune y Churra) recogidas durante un año, entre enero y diciembre del 2006 en el centro genético Ovigen (Zamora, España). Los animales se vacunaron con Miloxan (*Clostridium perfringens* tipo C, D y *Clostridium oedematiens* tipo B, Merial, Barcelona, España). Se administraron 2 ml de forma subcutánea a cada animal. Las muestras de semen incluidas en el análisis se recogieron en distintos periodos del año y se clasificaron en cuatro grupos: Grupo control 1 (CG1), individuos no vacunados, muestras recogidas entre los meses de Enero y Junio ($n=37$); Grupo vacunados 1 (VG1) individuos vacunados, muestras recogidas 20 días después de la vacunación ($n=33$) en Julio; Grupo vacunados 2 (VG2)

individuos vacunados, muestras recogidas 40 días después de la vacunación en Agosto (n=10) y Grupo control 2 (CG2), individuos vacunados al menos 70 días después de la vacunación, muestras recogidas entre Octubre y Diciembre (n=33). Veinte de las 37 muestras del CG1 con parámetros seminales (volumen, concentración, motilidad, acrosomas y endósmosis positiva) normales (Hafez y Hafez, 2000), se usaron para comparar el índice de fragmentación obtenido mediante el test SCD con el obtenido mediante el ensayo de ISNT.

Preparación de las muestras

Todas las muestras se recogieron con una vagina artificial. Inmediatamente después de la recogida, las muestras se diluyeron a una concentración final de 43×10^8 espermatozoides/ml en el medio de conservación Triladylt (Minitube, Verona, Wisconsin, Estados Unidos) y se congelaron en pajuelas de 0,2 ml. La edad de los animales osciló entre 2 y 4 años, eran animales sanos, y con condiciones de alimentación y fotoperiodo controladas.

Test SCD

Las muestras se procesaron usando el test SCD modificado para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de oveja (Sperm-*Ovis*-Halomax, ChromaCell SL, Madrid, España) según lo descrito anteriormente en las páginas 77 y 78. Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con mercuridibromofluoresceína y yoduro de propidio según lo descrito anteriormente en la página 62.

In situ Nick Translation

Se trabajó con 20 muestras de oveja con parámetros seminales normales, pertenecientes a 20 individuos distintos. Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en las páginas 78 y 79.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con la versión 17.0 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v.17).

Para valorar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo de ISNT, se efectuó un test no paramétrico U de Mann Whitney ($\alpha=0,05$).

Para identificar las diferencias significativas en los índices de fragmentación calculados en los distintos grupos de ovejas se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) y un análisis de comparación múltiple post hoc (método de Bonferroni) ($\alpha=0,05$).

4.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales.

Preparación de las muestras

Sus domesticus

Se trabajó con 2 muestras de semen con parámetros seminales normales según los criterios de Hafez y Hafez (2000) pertenecientes a 2 individuos adultos de entre 18 y 24 meses de la raza Ibérica, alojados en corrales cubiertos, alimentados una vez al día con alimento balanceado y acceso al agua *ad-libitum*. Las muestras se obtuvieron mediante la técnica de la *mano enguantada*, descartando la primera porción del eyaculado y filtrando la fracción de gel con una gasa estéril. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Homo sapiens

Se trabajó con dos muestras de semen normozoospermicas, según los criterios de WHO (1999), pertenecientes a 2 individuos sanos, tras obtener el consentimiento informado. Las muestras se recogieron mediante masturbación tras un periodo de abstinencia de 48-72 horas y se dejaron licuar completamente durante 15–30 minutos a 37°C. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Mus musculus

Se trabajó con 2 muestras de espermatozoides de ratón pertenecientes a 2 individuos adultos sanos de una población heterogénea alimentados con comida balanceada y agua *ad-libitum* y mantenidos a fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad en jaulas individuales. Los ratones fueron anestesiados con éter y sacrificados a las 8 semanas de vida. Se les extrajo la cola del epidídimo y se homogeneizó en 0,2 ml de solución tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) atemperado a 37°C. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Phascolarctos cinereus

Se trabajó con 2 muestras de semen de koala pertenecientes a 2 individuos sanos y sexualmente maduros donadas por el Dr. Johnston de la Universidad de Queensland, Australia.

Para el análisis las pajuelas se descongelaron en un baño térmico a 37°C durante 30 segundos. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Macropus giganteus

Se trabajó con 2 muestras de semen de canguro criopreservadas pertenecientes a 2 individuos sanos y sexualmente maduros donadas por el Dr. Johnston de la Universidad de Queensland, Australia. Para el análisis las pajuelas se descongelaron en un baño térmico a 37°C durante 30 segundos. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Vombatus ursinus

Se trabajó con 2 muestras de semen de wombat criopreservadas pertenecientes a 2 individuos sanos y sexualmente maduros donadas el Dr. Johnston de la Universidad de Queensland, Australia. Para el análisis las pajuelas se descongelaron en un baño térmico a 37°C

durante 30 segundos. Cada una de las muestras se diluyó a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

Ensayo cometa en dos dimensiones

Las muestras se procesaron según lo descrito anteriormente en la página 67.

Tratamiento con Alu I

Para inducir daño de cadena doble en el ADN de los espermatozoides, se usó la enzima de restricción Alu I (Roche, Basel, Suiza). Se trabajó con dos muestras, una de ellas de espermatozoides de koala y otra de espermatozoides de canguro. Después de la hora de lisis del protocolo del ensayo cometa anteriormente descrito, las preparaciones se lavaron con solución tampón TBE durante 20 minutos y se incubaron durante 10 minutos en exceso de tampón de reacción de enzima (Roche, Basel, Suiza) (50 µl por preparación). Posteriormente se añadieron a la preparación 15 µl de solución de reacción con 15 unidades de enzima, se cubrió con un cubreobjetos de *parafilm* (American National Can, Baltimore, Maryland, Estados Unidos), y se incubó en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 15 y 25 minutos. A continuación, las preparaciones se lavaron en TBE durante 10 minutos, se colocaron en la cubeta de electroforesis y se continuó el protocolo del ensayo cometa 2D descrito en la página 67.

Tratamiento con H₂O₂

Las muestras de semen de las especies estudiadas se diluyeron en tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml. A continuación, cada una de estas muestras se dividió en cuatro alícuotas de 200 µl cada una. Una de estas alícuotas de cada una de las especies analizadas se usó como control y, en el resto, los espermatozoides se trataron con concentraciones crecientes de H₂O₂ (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) al 0,003%, 0,03% y 0,3% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El índice de fragmentación de todas las muestras se analizó mediante el ensayo cometa 2D.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) para evaluar las diferencias significativas existentes en el índice de fragmentación entre las muestras de semen de placentarios y marsupiales analizadas, en todas las dosis de H_2O_2 probadas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos

Test SCD sobre espermatozoides humanos

En el test SCD, la desnaturalización y posterior desproteínización de los núcleos de los espermatozoides da lugar a nucleoides con halos de ADN disperso, que corresponden a bucles relajados de ADN unidos a una estructura nuclear residual llamada *core* (**Figura 14**). Los núcleos con el ADN intacto despliegan un halo de bucles de ADN fácil de identificar visualmente mientras que los núcleos con el ADN fragmentado son incapaces de dispersar estos bucles, resultando en nucleoides sin halo o con un halo de tamaño muy reducido (Fernández y col., 2005). Una muestra de semen humano procesada según el protocolo del test SCD, presenta cinco tipos de espermatozoides. La categorización de los distintos tamaños de halo se realiza usando como referencia el diámetro menor del *core*: (a) *espermatozoides con halo grande*, aquellos en los que la anchura del halo es superior al diámetro menor del *core*; (b) *espermatozoides con halo mediano*, aquellos en los que la anchura del halo es igual al diámetro menor del *core*; (c) *espermatozoides con halo pequeño*: aquellos en los que la anchura del halo es igual o menor a un tercio del diámetro menor del *core*; (d) *espermatozoides sin halo* y (e) *espermatozoides degradados*: parecidos a (d) pero poco teñidos o teñidos de forma irregular (**Figura 15**).

DBD-FISH

Los resultados de fragmentación de ADN obtenidos mediante el test SCD se correlacionan con los obtenidos tras la aplicación del ensayo DBD-FISH, asegurando que la producción o la ausencia de halo se corresponden efectivamente con el nivel de daño de ADN. Este ensayo confirma que los espermatozoides con halo pequeño, sin halo y degradados tienen su ADN fragmentado (**Figura 16**). De este modo, se comprueba que la fragmentación del ADN, reflejada como tamaño de halo, puede ser determinada de manera precisa usando el test SCD (Fernández y col., 2005).

Estudio de la variabilidad inter e intraobservador

Para estimar la variabilidad intra e inter observador en el conteo de espermatozoides con el ADN fragmentado, una alícuota de una muestra de semen congelado del mismo individuo se distribuyó a cuatro técnicos distintos y se procesó con el test SCD. Cada técnico analizó 500 células 3 veces al día en 2 días distintos. Se realizaron un total de 24 determinaciones. El promedio general de los resultados obtenidos fue de 10,96%. La varianza intra-observador se estimó a partir de los 6 conteos de cada técnico y fue en promedio 1,24%. La varianza inter-observador fue en promedio 2,21% al considerar todas las determinaciones realizadas. Un análisis de la varianza determinó que no existían diferencias significativas entre los cuatro técnicos en la media de espermatozoides con ADN fragmentado calculada. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los DFI calculados por el mismo técnico. Se prueba así la estabilidad de la determinación del DFI de una muestra de semen humano mediante el test SCD (**Tabla 2**).

Análisis de imagen digital en dos dimensiones

Además de la evaluación *de visu* de las preparaciones, se utilizó un sistema de análisis de imagen digital en dos dimensiones con el objetivo de clasificar los espermatozoides de una muestra procesada mediante el test SCD en los grupos celulares establecidos visualmente. Tras fotografiar 60 espermatozoides de cada tipo, se usó el programa informático *Leica Qwin Pro* para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide (**Figuras 17 a y b**). Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para ver si los valores de los parámetros medidos en cada tipo de espermatozoide presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$). Esto fue así para todos los parámetros estudiados (**Tabla 3**). Tres de los parámetros medidos (Perímetro, Nivel de grises Integrado y Varianza de Grises) permitieron caracterizar cada uno de los tipos de espermatozoide previamente establecidos *de visu*. De modo que cada célula puede ser clasificada correctamente en un tipo de espermatozoide de acuerdo con los valores de estos tres parámetros (**Tabla 4**).

Análisis de imagen digital en tres dimensiones

Además de la evaluación *de visu* de las preparaciones, se utilizó un sistema de análisis de imagen digital en tres dimensiones con el objetivo de clasificar las células de una muestra procesada mediante el test SCD en los grupos celulares establecidos visualmente. Tras fotografiar 50 espermatozoides de cada tipo, se usó programa informático *Volocity* para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide (**Figura 17 a y c**). Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para ver si los valores de los parámetros medidos en cada tipo de espermatozoide presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$). Esto fue así para todos los parámetros estudiados excepto para Centroides Y (**Tabla 5**). Algunos de los parámetros medidos (Área superficial (μm^2) y Centroides Z) permitieron caracterizar los tipos de espermatozoide previamente establecidos *de visu* salvo el tipo halo pequeño y sin halo que se encontraban al límite de la significancia ($p = 0,061$). La caracterización de cada uno de los tipos de espermatozoide previamente establecidos *de visu* fue posible utilizando los parámetros Área superficial (μm^2) y Centroides Z con una significación $p < 0,1$. De modo que cada célula puede ser clasificada correctamente en un tipo de espermatozoide de acuerdo con los valores de estos parámetros (**Tabla 6**).

5.2 La fragmentación del ADN de los espermatozoides de pacientes con varicocele

DFI y DDI en los grupos de estudio

Al comparar los DFI de las cuatro poblaciones analizadas, encontramos que los pacientes con varicocele (media \pm error estándar) ($32,4\% \pm 5,26\%$), los hombres infértiles con parámetros seminales anormales ($36,6\% \pm 1,53\%$) y los hombres infértiles normozoospermicos ($31,3\% \pm 2,32\%$) presentan un DFI superior y significativamente distinto (U Mann Whitney, $p < 0,05$) del grupo de hombres fértiles ($12,6\% \pm 1,0\%$). Esto no ocurre cuando el DFI del grupo de pacientes con varicocele se compara con los otros dos grupos estudiados: los hombres infértiles con parámetros seminales anormales y los hombres infértiles normozoospermicos. Ni tampoco cuando se comparan los DFI del grupo de pacientes infértiles con parámetros anormales y el de los hombres infértiles normozoospermicos. Se comprueba así que los tres

grupos de pacientes infértiles tienen DFIs significativamente distintos de los de los hombres fértiles pero estadísticamente iguales entre sí (**Figura 18 a y Tabla 7**).

Una situación distinta se observa cuando se evalúa la proporción de espermatozoides degradados en el total de espermatozoides con el ADN fragmentado (DDI/DFI). En el grupo de individuos con varicocele, este índice es superior y significativamente distinto (U Mann Whitney, $p < 0.05$) al del resto de grupos estudiados: pacientes infértiles con parámetros seminales anormales, infértiles normozoospermicos y hombres fértiles. Entre los tres últimos grupos, no se encontraron diferencias significativas en el DDI/DFI (**Figura 18 b y Tabla 7**).

En conclusión, los pacientes con varicocele presentan una tasa de espermatozoides degradados, espermatozoides con un alto nivel de daño, superior al del resto de grupos analizados (**Figura 19**).

Efecto de la temperatura

Los porcentajes medios de espermatozoides fragmentados (DFI) detectados a las 0, 3 y 6 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación en tampón fosfato a 34 y 37°C se presentan en la **Tabla 8**.

Se observó que la fragmentación del ADN de los espermatozoides continúa después de la eyaculación durante los 7 días de incubación *in vitro* (**Figura 20 a**), aumentando desde (media \pm error estándar) 22,50% \pm 2,68% hasta 99,88% \pm 0,13 a los 6 días a 34°C; y aumentando desde 22,50% \pm 2,68% hasta 99,75% \pm 0,25% a los 5 días a 37°C.

Los porcentajes medios de espermatozoides degradados (DDI) detectados a las 0, 3 y 6 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación en tampón fosfato a 34 y 37°C se recogen en la **Tabla 9**.

Se observó que la degradación del ADN de los espermatozoides continúa después de la eyaculación durante los 7 días de incubación *in vitro* (**Figura 20 b**), aumentando desde (media \pm error estándar) 6,50% \pm 0,96% hasta 59,38% \pm 9,60% a los 7 días a 34°C; y aumentando desde 6,50% \pm 0,96% hasta 72,56% \pm 7,753% a los 7 días a 37°C.

Si se construyen curvas de supervivencia a partir de los datos de fragmentación para ambas temperaturas, 34 y 37°C, considerando los espermatozoides con el ADN intacto como espermatozoides vivos y los espermatozoides con el ADN dañado como espermatozoides muertos, un análisis estadístico (Test de Breslow) indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas. Indicando que la dinámica de la fragmentación es distinta a lo largo del tiempo a 34 y 37°C. Se comprueba que la fragmentación del ADN aumenta más rápidamente a 37°C (**Figura 21 a**).

Si se construyen curvas de supervivencia a partir de los datos de degradación para ambas temperaturas, 34 y 37°C, considerando los espermatozoides no degradados como espermatozoides vivos y los espermatozoides degradados como espermatozoides muertos, un análisis estadístico (Test de Breslow) indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas. Indicando que la dinámica de la degradación es distinta a lo largo del tiempo a 34 y 37°C. Se observa que la degradación aumenta más rápidamente a 37°C (**Figura 21 b**).

Se comprueba que el progreso de la fragmentación del ADN de los espermatozoides *in vitro*, observado en el experimento, es más rápido a 34°C que a 37°C. Asimismo, el progreso de la degradación espermática es más rápido e intenso a 34°C que a 37°C.

Efecto del estrés oxidativo

Los porcentajes medios de espermatozoides fragmentados (DFI) detectados a las 0, 12 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación en distintas concentraciones de H_2O_2 se presentan en la **Tabla 10**.

Se observa que la fragmentación del ADN de los espermatozoides se ve afectada por la concentración de H_2O_2 , en un efecto dosis-respuesta (**Figura 22 a**).

Los porcentajes medios de espermatozoides degradados (DDI) detectados a las 0, 12 horas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de incubación a distintas concentraciones de H_2O_2 se presentan en la **Tabla 11**.

Se observa que la degradación del ADN de los espermatozoides se ve afectada por la concentración de H_2O_2 , en un efecto dosis-respuesta (**Figura 22 b**).

Si se construyen curvas de supervivencia a partir de los datos de fragmentación para cada uno de los tratamientos utilizados, considerando los espermatozoides con el ADN intacto como espermatozoides vivos y los espermatozoides con el ADN dañado como espermatozoides muertos, un análisis estadístico (Test de Breslow) indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas. Indicando que la dinámica de la fragmentación es distinta a distintas concentraciones de H_2O_2 (**Figura 23 a**).

Si se construyen curvas de supervivencia a partir de los datos de degradación para cada una de las dosis de H_2O_2 utilizadas, considerando los espermatozoides no degradados como espermatozoides vivos y los espermatozoides degradados como espermatozoides muertos, un análisis estadístico (Test de Breslow) indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas. Indicando que la dinámica de la degradación es distinta a distintas concentraciones de H_2O_2 (**Figura 23 b**).

Se comprueba que el progreso *in vitro* de la fragmentación del ADN de los espermatozoides, observado en el experimento, es más rápido a concentraciones elevadas de H_2O_2 . Asimismo, el progreso de la degradación del ADN espermático *in vitro* también se ve acelerada en condiciones de estrés oxidativo.

5.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos.

Tipos de cometas 2D

El ensayo cometa 2D produce la migración del ADN en dos ejes. La migración en el eje X (de derecha a izquierda), corresponde a la primera electroforesis (neutra), en la que el ADN migra en una conformación de cadena doble. La migración en el eje Y (de arriba a abajo) corresponde a la segunda electroforesis (alcalina), en la que el ADN migra en una conformación de cadena sencilla. Los tipos de cometa 2D obtenidos se representan en la **Figura 24**. Los mismos resultados se obtuvieron sobre muestras de leucocitos.

Detección de ADN de cadena sencilla mediante FISH

Para identificar el tipo de daño presente en cada una de las colas de cometa generadas por el ensayo, se realizó una FISH sobre preparaciones de espermatozoides humanos procesadas previamente con el ensayo cometa 2D con una sonda de ADN genómico humano. Los resultados confirmaron que la cola del cometa situada en el eje Y está formada principalmente por ADN de cadena sencilla (**Figura 25 a y b**).

Tinción con naranja de acridina

Para corroborar estos resultados se realizó otra prueba usando el fluorocromo naranja de acridina. Este fluorocromo, en una concentración concreta ($0,5 \times 10^{-4}$ M), permite discriminar entre ADN de cadena sencilla y doble en espermatozoides humanos procesados previamente con el ensayo cometa 2D. Por las propiedades metacromáticas del fluorocromo, el ADN que emitía fluorescencia verde se consideró de cadena doble, y el que emitía fluorescencia roja se consideró de cadena sencilla. Los colores coincidían perfectamente con la distribución del ADN de cadena doble y sencilla en los ejes X e Y respectivamente. Así, el fluorocromo naranja de acridina puede usarse a esta concentración como marcador de roturas de ADN de cadena doble y sencilla (**Figura 25 c y d**).

Inducción de daño de ADN de cadena sencilla y doble

Para probar que este ensayo era capaz de detectar adecuadamente el daño de ADN de cadena sencilla y doble, una muestra de semen normal se trató de manera independiente con H_2O_2 y la enzima de restricción Alu I. El primero genera roturas de ADN de cadena sencilla mientras que la segunda es un productor de roturas de cadena doble. Los resultados se expresaron como la frecuencia de células con el ADN fragmentado discriminando entre DFI ss cuando se trataba de roturas de cadena sencilla y DFI ds cuando se trataba de roturas de cadena doble.

En las muestras tratadas con H_2O_2 , la frecuencia de espermatozoides con la cola del cometa en el eje Y, es decir, con roturas de ADN de cadena sencilla, aumentó de manera

significativa (χ^2 , $p<0,05$) con la concentración, mientras que no se observó ningún cambio en la frecuencia de espermatozoides con la cola del cometa en el eje X, es decir, con roturas de ADN de cadena doble (**Tabla 12 y Figura 26 a**).

En las muestras digeridas con Alu I, los resultados fueron a la inversa, se observó un aumento significativo (χ^2 , $p<0,05$) en la frecuencia de espermatozoides con roturas de ADN de cadena doble (**Tabla 12 y Figura 26 b**).

El mismo experimento se realizó sobre leucocitos humanos y se obtuvieron resultados similares (**Tabla 13, Figura 27**).

Se prueba así que la primera lisis y electroforesis neutras detectan roturas de ADN de cadena doble y que la segunda lisis y electroforesis revelan roturas de ADN de cadena sencilla. Por tanto, el ensayo cometa 2D se presenta como un método eficaz para la detección y la discriminación simultánea de roturas de ADN de cadena doble y sencilla en el mismo espermatozoide.

Análisis de imagen digital

Además de la evaluación *de visu* de las preparaciones, se utilizó un sistema de análisis de imagen digital con el objetivo de clasificar las células de una muestra procesada mediante el ensayo cometa 2D en los grupos celulares establecidos visualmente (**Figura 28**). Tras fotografiar 20 cometas de cada tipo, se usó el *Leica Qwin Pro* para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para ver si los valores de los parámetros medidos en cada tipo de cometa presentaban diferencias significativas ($p<0,05$). Esto fue así para todos los parámetros excepto para Máximo de grises. Algunos de los parámetros medidos (Media de grises y Mínimo de grises) permitieron caracterizar cada uno de los tipos de cometa previamente establecidos *de visu*. De modo que cada espermatozoide puede ser clasificado correctamente en un tipo de cometa de acuerdo con los valores de estos parámetros (**Tabla 14**).

Variaciones en el conteo

La variabilidad inter ensayo se estimó midiendo la misma muestra de semen humana normozoospermica en 5 ensayos diferentes (A, B, C, D, E). La variabilidad intra ensayo se determinó mediante la evaluación de la misma muestra 5 veces en un mismo ensayo (A1, A2, A3, A4, A5). Un test de X^2 mostró que no existían diferencias significativas en la presencia de los distintos tipos de cometa entre los cinco ensayos realizados (A, B, C, D, E). Tampoco en las 5 determinaciones realizadas en un mismo ensayo (A1, A2, A3, A4, A5) (**Tabla 15**).

5.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida

Swim up vs centrifugación en gradiente de densidad

Los resultados de los análisis realizados en las muestras de semen estudiadas se muestran en la **Tabla 16**.

La motilidad media de las muestras aumentó de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) tras ser procesadas mediante centrifugación en gradiente de densidad o *swim up*. No se encontraron diferencias significativas en la motilidad de los espermatozoides de las fracciones recuperadas mediante ambas técnicas (**Figura 29**).

El porcentaje de espermatozoides con daño de ADN y el porcentaje de espermatozoides degradados (con alto nivel de daño de ADN), calculado mediante SCD, se redujo de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en las fracciones recuperadas mediante ambos métodos, centrifugación en gradiente de densidad y *swim up* (**Figura 30**). De la misma manera, el porcentaje de espermatozoides con roturas de ADN de cadena doble, calculado mediante el ensayo cometa 2D, se redujo de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en las fracciones recuperadas mediante ambos métodos (**Figura 31 a**). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con roturas de ADN de cadena sencilla, calculado mediante el ensayo cometa 2D, disminuyó de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) únicamente en la fracción recuperada mediante centrifugación en gradiente de densidad. Los espermatozoides

recuperados mediante *swim up* no presentaron una frecuencia de espermatozoides con roturas de ADN de cadena sencilla significativamente distinta de la del semen puro (**Figura 31 b**).

Aunque el *swim up* y la centrifugación en gradiente de densidad presentan una capacidad de recuperación de espermatozoides móviles similar, y ambos métodos son igualmente eficaces a la hora de eliminar espermatozoides fragmentados (SCD), degradados y espermatozoides con roturas de ADN de cadena doble. El método de recuperación mediante gradiente de densidad presentado en este trabajo reduce el nivel de fragmentación de ADN de cadena sencilla de una muestra de semen humano de manera más eficaz que el *swim up*.

Relación de la fragmentación del ADN con los parámetros del espermiograma habitual: muestras normozoospermicas y no normozoospermicas

Los resultados de los análisis realizados en las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas estudiadas se muestran en la **Tabla 17**.

En el semen puro, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) entre las muestras normozoospermicas y las no normozoospermicas en la concentración y la motilidad de los espermatozoides. Ambas resultaron ser significativamente ($p < 0,05$) superiores en las muestras normozoospermicas (concentración: $58,16\% \pm 3,97\%$ versus $48,04\% \pm 3,77\%$; y motilidad (%A+B): $60,96\% \pm 0,987\%$ versus $44,23\% \pm 1,38\%$) (**Figuras 32 a y 33 a**).

Además, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI y el DDI del ADN de los espermatozoides, calculado mediante el test SCD, entre las muestras normozoospermicas y las no normozoospermicas. Las muestras normozoospermicas tenían un índice de fragmentación y de degradación significativamente ($p < 0,05$) inferior a las no normozoospermicas ($25,24\% \pm 1,76\%$ versus $32,31\% \pm 2,08\%$ y $7,03\% \pm 0,63\%$ versus $10,57\% \pm 0,99\%$ respectivamente) (**Figuras 34 a y 35 a**). No se encontraron diferencias significativas en los índices de fragmentación calculados mediante el ensayo cometa 2D en los grupos analizados.

En el semen recuperado, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la concentración de espermatozoides entre las muestras normozoospermicas y las no normozoospermicas ($43,01\% \pm 2,24\%$ versus $13,62\% \pm 3,08\%$) (**Figura 32 b**).

Además, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI y el DDI de ADN de espermatozoides calculado mediante el test SCD entre las muestras recuperadas normozoospermicas y las no normozoospermicas. Las muestras normozoospermicas tenían un DFI y un DDI significativamente ($p < 0,05$) inferiores a los de las no normozoospermicas ($14,94\% \pm 1,63\%$ versus $20,92\% \pm 3,86\%$ y $2,53\% \pm 0,41\%$ versus $7,08\% \pm 2,20\%$ respectivamente) (**Figuras 34 b y 35 b**). No se encontraron diferencias significativas en los índices de fragmentación calculados mediante el ensayo cometa 2D en los grupos analizados.

Las muestras normozoospermicas estudiadas, tanto en el semen puro como en el recuperado, tenían un DFI y un DDI significativamente ($p < 0,05$) inferiores a los de las no normozoospermicas. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas en los DFI calculados mediante el ensayo cometa 2D en los grupos analizados.

Se realizaron una serie de correlaciones entre los distintos parámetros indicadores de la calidad seminal evaluados (**Tabla 18**). La motilidad (%A+B) correlacionó de manera negativa y estadísticamente significativa (Rho de Spearman, $p < 0,05$) con el DFI y el DDI calculado mediante el test SCD y con el DFI ds calculado mediante el ensayo cometa 2D. El DFI calculado mediante el test SCD correlacionó de manera positiva y estadísticamente significativa (Rho de Spearman, $p < 0,05$) con el DDI, el DFI ss y el DFI ds. El DDI calculado mediante el test SCD correlacionó de manera positiva y estadísticamente significativa (Rho de Spearman, $p < 0,05$) además con el DFI ss y el DFI ds calculados mediante el ensayo cometa 2D. El DFI ss correlacionó de manera positiva y estadísticamente significativa (Rho de Spearman, $p < 0,05$) con el DFI ds.

Con la idea de estimar los índices de fragmentación de cadena sencilla y doble calculados por el ensayo cometa 2D a partir de los índices de fragmentación y degradación obtenidos mediante el test SCD, se realizaron unos análisis de regresión lineal (**Tabla 19**). En el análisis de regresión lineal del DFI-SCD y el DFI ss, la regresión es significativa pero R^2 está tan

próximo a cero que la variación en la variable independiente (DFI-SCD) apenas explica el 3,2% de la variación de la variable dependiente (DFI ss). Por el contrario, en el caso del análisis de regresión lineal del DFI-SCD y el DFI ds, la variación de la variable independiente (DFI-SCD) explica el 27,7% de la variación de la variable dependiente (DFI ds) (**Figura 36 a**).

En el análisis de regresión lineal del DDI y el DFI ss y del DDI y el DFI ds, la regresión es significativa sólo en el último caso, pero con un R^2 tan próximo a cero que la variación de la variable independiente (DDI) explica tan sólo el 5,8% de la variación de la variable dependiente (DFI ds) (**Figura 36 b**).

De manera que el DFI calculado mediante el test SCD y el DFI ds calculado mediante el ensayo cometa 2D están relacionados pues la variación del DFI-SCD explica el 27,7% de la variación del DFI ds. Esta relación no existe entre el DFI-SCD y el DFI ss ni entre el DDI y el DFI ss ni el DFI ds.

Éxito o fracaso de embarazo en IUI

Los resultados de los análisis realizados en las muestras de semen estudiadas se muestran en la **Tabla 20**.

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides (millones/ml) entre el grupo de muestras de semen recuperado con éxito de embarazo en IUI y el grupo de muestras de semen recuperado con fracaso de embarazo en IUI. Las muestras que habían conseguido un embarazo tenían una concentración significativamente (U Mann Whitney, $p < 0,05$) superior que las que habían fracasado ($48,25 \pm 7,14$ versus $34,53 \pm 2,43$, respectivamente) (**Figura 37 a**). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los otros parámetros del espermograma habitual entre las muestras de semen recuperado con éxito de embarazo en IUI y las muestras con fracaso de embarazo en IUI.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en el DFI calculado mediante el test SCD, el DDI y el DFI ss calculados para muestras de semen recuperado con éxito de embarazo en IUI y muestras con fracaso de embarazo en IUI. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ds calculado mediante el ensayo cometa 2D

entre las muestras recuperadas con éxito de embarazo y las muestras con fracaso de embarazo ($6,56\% \pm 2,27\%$ versus $4,81\% \pm 0,71\%$ respectivamente). Este DFI ds, aunque bajo, es superior en las muestras con éxito de embarazo (**Figura 37 b**).

De manera que la fragmentación de ADN, medida con el test SCD o con el ensayo cometa 2D no parece tener valor predictivo del embarazo en IUI. Sin embargo, los resultados indican que la concentración de espermatozoides de las muestras recuperadas podría ser indicativa del éxito o fracaso del embarazo en IUI.

Éxito o fracaso de embarazo en FIV/ICSI

Los resultados de los análisis realizados en las muestras de semen estudiadas se muestran en la **Tabla 21**.

En el semen total o puro, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con éxito de embarazo en FIV/ICSI y las muestras con fracaso de embarazo en FIV/ICSI, en ninguno de los parámetros del espermiograma habitual estudiados. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI de ADN de espermatozoides calculado mediante el test SCD entre las muestras con éxito de embarazo y las muestras con fracaso de embarazo en FIV/ICSI. Las muestras que habían fracasado tenían un índice de fragmentación significativamente ($p < 0,05$) superior que las que habían conseguido un embarazo ($39,90\% \pm 5,61\%$ versus $24,06\% \pm 2,35\%$, respectivamente) (**Figura 38 a**). El resto de los índices de fragmentación calculados no presentaron diferencias significativas entre estos grupos.

En el semen recuperado, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con éxito de embarazo y las muestras con fracaso de embarazo en FIV/ICSI, en ninguno de los parámetros del espermiograma habitual estudiados. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ss+ds de espermatozoides, calculado mediante el ensayo cometa 2D. Las muestras que no habían conseguido embarazo tenían un DFI ss+ds significativamente ($p < 0,05$) superior al de las que habían tenido éxito en el embarazo ($57,88\% \pm 15,50\%$ versus $29,75\% \pm 8,81\%$ respectivamente) (**Figura 38 b**). El resto de los índices de fragmentación calculados no presentaron diferencias significativas entre los grupos.

5.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN

Protocolo del test SCD desarrollado para espermatozoides humanos (Halosperm)

Los espermatozoides de cerdo procesados con el protocolo del test SCD desarrollado para espermatozoides humanos (Halosperm) (este método incluye un tratamiento ácido previo a la lisis), dan lugar a nucleoides de características similares a los obtenidos en espermatozoides humanos (**Figura 39 a y b**). Los espermatozoides con el ADN fragmentado no presentan o presentan halos de dispersión de los bucles de ADN muy pequeños, mientras que los espermatozoides con el ADN intacto liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa. La fragmentación de ADN en estos nucleoides se confirmó mediante un ensayo DBD-FISH de los ADNs de cadena sencilla, generados por el tratamiento ácido a partir de los extremos de las roturas de ADN, usando una sonda de ADN genómico de cerdo (**Figura 39 c**) y una sonda de ADN genómico humano (**Figura 39 d**). En el ensayo DBD-FISH, sólo los núcleos con el ADN fragmentado son susceptibles de ser hibridados. En este caso, únicamente se marcaron aquellos núcleos que no presentaban halos de dispersión de ADN. No obstante, la discriminación de los espermatozoides de acuerdo con el tamaño de halo no es fácil de establecer en las muestras de espermatozoides de cerdo, pues el tamaño de los halos no es tan grande como en el caso de los espermatozoides humanos. También se observó cierta variabilidad en la intensidad de la hibridación en los espermatozoides de cerdo entre los distintos núcleos espermáticos marcados (**Figura 39 c**). De manera que el protocolo ácido-lisis del test SCD (Halosperm) es el método que mejor discrimina los núcleos con el ADN fragmentado de los no fragmentados en espermatozoides humanos pero no parece adecuado para estimar la fragmentación en muestras de espermatozoides de cerdo.

Protocolo SCD desarrollado para espermatozoides de cerdo (Sperm-Sus-Halomax)

Esta variante del test SCD consiste únicamente en una incubación rápida en una solución de lisis de membranas y proteínas. El uso de este método en espermatozoides humanos da lugar a halos en los núcleos espermáticos con el ADN fragmentado que no se diferencian fácilmente de los núcleos con el ADN intacto. Los espermatozoides de cerdo tratados

con el protocolo modificado del test SCD incluido en el kit Sperm-*Sus*-Halomax, dan lugar a tres grupos de espermatozoides de acuerdo con la morfología del halo: nucleoides con grandes halos de difusión de la cromatina, nucleoides sin halo y nucleoides con una relajación mínima de los bucles de ADN en la región proximal cerca del flagelo (**Figuras 40 y 41 a-d**).

ISNT sobre muestras de espermatozoides de cerdo procesadas con Sperm-Sus-Halomax

La presencia de roturas en los núcleos espermáticos de cerdo se validó mediante la incorporación directa de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. Este ensayo, realizado sobre preparaciones procesadas previamente con el protocolo modificado del test SCD (Sperm-*Sus*-Halomax), reveló la incorporación masiva de nucleótidos marcados en los núcleos de espermatozoides con grandes halos de cromatina dispersa, confirmándose así, la presencia de roturas de ADN en estos núcleos (**Figura 41 e**). De acuerdo con el nivel de incorporación de nucleótidos, se observaron tres tipos distintos de espermatozoides, similares a los descritos anteriormente usando la microscopía de campo claro (**Figura 41 f-h**). De manera que los nucleoides con grandes halos de cromatina dispersa corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado y los nucleoides sin halo o con una relajación mínima de los bucles de ADN cerca del flagelo corresponden a núcleos espermáticos con el ADN intacto.

De acuerdo con este criterio, se calculó el índice de fragmentación de 10 cerdos usando tres técnicas distintas para la evaluación del daño de ADN, el test SCD, el ensayo ISNT y el ensayo DBD-FISH (**Figura 42**). Una ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre individuos y técnicas. Un test de Bonferroni mostró que no existían diferencias significativas entre los resultados del test SCD y del ensayo ISNT. Sin embargo, sí detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados del DBD-FISH y las otras dos técnicas. Un análisis de Tuckey permitió establecer tres grupos diferentes de individuos con respecto al DFI: bajo, medio y alto (**Figura 42**). Aunque, como se ha dicho antes, existen diferencias entre las técnicas, la clasificación de los individuos con respecto a su DFI es la misma independientemente de la técnica utilizada. Es decir, aquellos cerdos con bajo DFI establecido con el test SCD modificado o el ensayo ISNT también presentaron un DFI bajo al usar la prueba DBD-FISH. Mientras que aquellos cerdos con alto DFI calculado con el test SCD o el ensayo

ISNT también presentaron un DFI alto evaluado mediante la prueba DBD-FISH. Estos resultados validan el uso de cualquiera de estas técnicas para la clasificación de individuos con distintos niveles de daño de ADN.

Análisis de imagen digital

Además de la evaluación *de visu* de las preparaciones, se utilizó un sistema de análisis de imagen digital con el objetivo de clasificar las células de una muestra procesada con el test SCD modificado para ser utilizado sobre espermatozoides de cerdo en los grupos celulares establecidos visualmente (**Figura 43**). Se trabajó con 4 cerdos cuyos DFIs eran 4,06%; 3,15%; 44,65% y 47,95%. Tras fotografiar 30 espermatozoides por muestra (n=120), se usó el programa informático *Leica Qwin Pro* para tomar medidas cuantitativas de cada espermatozoide.

Se realizó un análisis de U de Mann Whitney para ver si los valores de los parámetros medidos en cada tipo de espermatozoide presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$). Esto fue así para todos los parámetros estudiados (Píxeles, Suma de grises y Media de grises) (**Tabla 22**). Todos y cada uno de los parámetros medidos permitieron caracterizar cada uno de los tipos de espermatozoide previamente establecidos *de visu*. De modo que cada espermatozoide puede ser clasificado correctamente en un tipo de morfología de halo de acuerdo con los valores de estos parámetros.

Dinámica de la fragmentación del ADN en el tiempo: efecto de la temperatura y del uso de diluyentes

El porcentaje medio de espermatozoides fragmentados detectado a los 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días de incubación en tampón fosfato a 15 y 37°C se presenta en la **Figura 44 a**. Se observa que la fragmentación del ADN de los espermatozoides continúa después de la eyaculación durante los 12 días de incubación *in vitro* a 15°C, aumentando desde (media \pm error estándar) 2,06% \pm 0,29%, después de 24 horas, hasta 19,21% \pm 4,44% a los 12 días; y a 37°C aumentando desde 2,15% \pm 0,27%, después de 24 horas, hasta 36,64% \pm 8,48% a los 12 días. Se detectaron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) entre los DFI medios a las 24 horas y a los 12 días de incubación a 15°C y a 37°C.

El aumento del índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides se impide con el uso del diluyente comercial Acromax. Los porcentajes medios de espermatozoides con el ADN fragmentado a los 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días de incubación con Acromax a 15 y 37°C se representan en la **Figura 44 b**. Como se puede observar, la fragmentación del ADN de los espermatozoides incubados en Acromax no varía después de 12 días de incubación *in vitro* ni a 15 ni a 37°C.

Dinámica de la fragmentación del ADN y de los parámetros clásicos indicadores de la calidad seminal en el tiempo: efecto de la temperatura y del uso de diluyentes

En esta parte del estudio, se investiga si el progreso *in vitro* de la fragmentación del ADN en espermatozoides está asociado con otros signos de deterioro espermático como la motilidad, el estado del acrosoma, o la integridad de la membrana plasmática. Los resultados del análisis de estos parámetros en 6 muestras de semen seleccionadas incubadas durante 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días a 15 y 37°C en tampón fosfato y Acromax se muestran en las **Figuras 45 y 46**.

Un análisis de correlación confirma la existencia de una correlación negativa y estadísticamente significativa (Rho de Spearman, $p < 0,05$) entre el DFI y los parámetros clásicos indicadores de la calidad seminal en las muestras incubadas en tampón fosfato (**Tablas 23 y 24**).

Los resultados confirman que el progreso *in vitro* de la fragmentación del ADN en espermatozoides incubados en tampón fosfato a 15 y 37°C está asociado con el descenso de algunos parámetros indicadores de la calidad seminal como la motilidad, el estado del acrosoma o la integridad de la membrana plasmática (**Figura 45**). Esta correlación no existe en las muestras incubadas en Acromax (**Figura 46 y Tabla 24**).

Efecto de la ADNasa I y del EDTA en la fragmentación del ADN en espermatozoides

A continuación, se realizaron una serie de experimentos con el objetivo de entender los mecanismos responsables de la fragmentación del ADN observada *in vitro*. Para estudiar si esta fragmentación de ADN en espermatozoides era debida a la actividad de nucleasas espermáticas, se incubaron los espermatozoides durante 1, 2, 3, 5, 7 y 12 días, a 15 y 37°C, en presencia y ausencia de ADNasa I y en presencia y ausencia de EDTA. Como se muestra en las **Figuras 47, 48 y 49**, ambos tratamientos afectaron al índice de fragmentación del ADN en todos los tiempos

de incubación, especialmente a 37°C. La adición de ADNasa I aumentó de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) el DFI de todas las muestras incubadas en tampón fosfato a lo largo del tiempo (**Figura 47**). Mientras que este efecto era inhibido por la adición de EDTA incluso en ausencia de actividad endonucleasa exógena (**Figuras 48 y 49**). La adición de EDTA inhibió de manera significativa (U Mann Whitney, $p < 0,05$) el aumento del DFI de todas las muestras incubadas en tampón fosfato a lo largo del tiempo.

En conclusión, en este estudio se encuentra que la fragmentación de espermatozoides *in vitro*, ocurre tras la eyaculación en las condiciones experimentales estudiadas sin la intervención de ningún factor externo, aumenta asociada al descenso del resto de los parámetros indicadores de la calidad seminal analizados y se ve acelerada por efecto de la temperatura. La adición de ADNasa I acelera el progreso de la fragmentación de ADN *in vitro* y la adición de EDTA inhibe este progreso. Estos resultados sugieren que una actividad endonucleasa, producida de manera endógena podría ser responsable del progreso de la fragmentación del ADN de los espermatozoides *in vitro* en las condiciones de conservación estudiadas.

5.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN

Test SCD sobre espermatozoides de toro

Cuando los espermatozoides de toro se procesan con el test SCD modificado para ser utilizado sobre espermatozoides bovinos se originan dos tipos de núcleos espermáticos. Algunos espermatozoides liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa, mientras que otros, producen halos de dispersión de la cromatina muy pequeños (**Figura 50**).

La presencia de roturas en los núcleos espermáticos se validó mediante la incorporación directa de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. En este ensayo se comprueba que, los espermatozoides con grandes halos de cromatina dispersa tienen su ADN nuclear fragmentado, mientras que aquellos espermatozoides con halos de dispersión de la cromatina pequeños tienen su ADN nuclear intacto (**Figura 51**).

De acuerdo con este criterio, se calculó el índice de fragmentación de 17 toros usando las dos técnicas, el test SCD y el ensayo ISNT. Los resultados se muestran en la **Figura 52**. El índice de fragmentación medio calculado mediante el test SCD (media \pm error estándar) ($11,35\% \pm 2,81\%$) resultó ser similar al obtenido mediante el ensayo ISNT ($12,18\% \pm 2,90\%$), no se encontraron diferencias significativas en los DFIs calculados por estas técnicas en ninguna de las 17 muestras analizadas.

Además, en estas 17 muestras se analizaron, junto con el índice de fragmentación, otros parámetros indicadores de la calidad seminal como la concentración, la motilidad, la morfología, la integridad de la membrana plasmática, la vitalidad y la integridad acrosómica. Al comparar los índices de fragmentación con los resultados del espermiograma, se encontró que no existía correlación significativa entre el DFI y ninguno de los parámetros seminales estudiados (**Tabla 25**). La vitalidad correlaciona de manera significativa (Rho de Spearman, $p < 0.05$) con la integridad acrosómica, la integridad de la membrana plasmática y la motilidad progresiva. La integridad de membrana correlaciona de manera significativa (Rho de Spearman, $p < 0.05$) con la integridad acrosómica y la motilidad progresiva (**Tabla 25**).

El test SCD permite el análisis rutinario del DFI de muestras de espermatozoides de toro, así como la investigación básica y clínica en este tema en el laboratorio de análisis seminal. Este parámetro podría proporcionar información adicional útil acerca de la calidad seminal de estos animales pues no correlaciona con los parámetros seminales analizados de forma rutinaria.

Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN

El test SCD permite la evaluación simultánea de la morfología y la fragmentación de ADN en espermatozoides (**Tabla 26**). En los 17 eyaculados de toro analizados se detectaron cuatro tipos de espermatozoides: (a) espermatozoides morfológicamente normales con el ADN nuclear intacto (media \pm error estándar) ($81,92\% \pm 2,66\%$); (b) espermatozoides morfológicamente anormales con el ADN nuclear intacto ($18,08\% \pm 2,66\%$) (c) espermatozoides morfológicamente normales con el ADN nuclear fragmentado ($38,66\% \pm 5,00\%$) y (d) espermatozoides morfológicamente anormales con el ADN nuclear fragmentado ($61,34\% \pm 5,00\%$). Los

porcentajes están calculados sobre el total de células con el ADN nuclear intacto (a y b) y sobre el total de células con el ADN fragmentado (c y d).

Las **Figuras 53 y 54** muestran la variedad de anomalías morfológicas encontradas en las muestras de semen analizadas en espermatozoides con el ADN fragmentado e intacto. Las proporciones (media \pm error estándar) de estas anomalías se muestran en la **Tabla 27**. En las células fragmentadas la anomalía morfológica más abundante es la cabeza suelta anormal (anomalía *major*) y la menos abundante, la cola truncada (anomalía *minor*). En las células no fragmentadas la anomalía morfológica más abundante es la cola enrollada (anomalía *minor*) y las menos abundantes son la mayoría de las anomalías *major*. Algunas anomalías morfológicas como formas dobles, cabezas con la base estrecha, cabezas pequeñas, colas cortas o gotas citoplasmáticas proximales se observaron exclusivamente en espermatozoides con el ADN fragmentado.

La proporción media de anomalías morfológicas (IA) es significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) superior en los espermatozoides con el ADN fragmentado (media \pm error estándar) ($61,34\% \pm 5,00\%$) comparado con los espermatozoides con el ADN intacto ($18,08\% \pm 2,66\%$) (**Figura 55 a**). Esto mismo ocurre cuando las muestras de los 17 toros se analizan por separado (X^2 , $p < 0,05$). Cuando se analizan la proporción de anomalías morfológicas *major* y la proporción de anomalías morfológicas *minor* en ambos grupos de espermatozoides fragmentados y no fragmentados, los resultados indican que no existen diferencias significativas en la proporción de anomalías morfológicas *minor* entre los espermatozoides fragmentados (media \pm error estándar) ($14,46\% \pm 3,22\%$) y los no fragmentados ($16,78\% \pm 2,46\%$) (**Figura 55 b**). Esto mismo ocurre cuando las muestras de los 17 toros se analizan por separado (X^2 , $p < 0,05$). Sin embargo, en el caso de la proporción de anomalías *major*, estas diferencias sí son significativas (ANOVA, $p < 0,05$) cuando se compara el grupo de espermatozoides fragmentados ($46,88\% \pm 4,93\%$) con el de los no fragmentados ($1,30\% \pm 0,39\%$) (**Figura 55 c**). Esto mismo ocurre cuando las muestras de los 17 toros se analizan por separado (X^2 , $p < 0,05$).

De manera que la mayoría de las anomalías presentes en las células fragmentadas son del tipo *major* ($46,88\% \pm 4,93\%$ de anomalías *major* frente al $14,46\% \pm 3,22\%$ de anomalías *minor*), mientras que en el caso de las células con el ADN intacto, la mayoría de las anomalías

presentes son del tipo *minor* ($16,78\% \pm 2,46\%$ de anomalías *minor* frente al $1,30\% \pm 0,39\%$ de anomalías *major*).

5.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración del espermatozoide con la fragmentación del ADN.

Test SCD sobre espermatozoides de ratón

Cuando los espermatozoides de ratón se procesan con el protocolo del test SCD modificado se originan dos tipos de núcleos espermáticos: algunos espermatozoides liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa, mientras que otros, producen halos de dispersión de la cromatina muy pequeños (**Figura 56**).

La presencia de roturas en los núcleos espermáticos se validó mediante la incorporación directa de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. En este ensayo se confirma que los espermatozoides con grandes halos de cromatina dispersa tienen su ADN nuclear fragmentado, mientras que aquellos espermatozoides con halos de dispersión de la cromatina pequeños tienen su ADN nuclear intacto (**Figura 57**). De acuerdo con este criterio, se calculó el índice de fragmentación de 20 ratones usando las dos técnicas, el test SCD y el ensayo ISNT, los resultados se muestran en la **Figura 58**. El índice de fragmentación medio calculado mediante el test SCD (media error \pm estándar) ($4,07\% \pm 0,99\%$) resultó ser similar al obtenido mediante el ensayo ISNT ($5,13\% \pm 1,08\%$). No se encontraron diferencias significativas en los índices calculados por esta técnica en ninguna de las 20 muestras analizadas.

En un estudio poblacional más amplio, en el que se analizó el índice de fragmentación de 65 muestras de semen de ratón, esta vez usando únicamente el test SCD, los resultados obtenidos muestran que los niveles basales de fragmentación de ADN en una muestra representativa de ratones van de $0,11\%$ a $44,00\%$, con una media \pm error estándar de $12,36\% \pm 1,49\%$.

El protocolo del test SCD modificado para ser utilizado en espermatozoides de ratón permite el análisis rutinario del DFI de muestras de espermatozoides de ratón, así como la investigación básica y clínica en este tema en el laboratorio de análisis seminal.

Motilidad en las regiones caput, corpus y cauda del epidídimo de ratón

La mayoría de los espermatozoides del epidídimo de las tres regiones analizadas eran móviles ($71,20\% \pm 1,32\%$). No se encontraron diferencias significativas entre las tres regiones del epidídimo.

Evaluación de la integridad del ADN y la cromatina del espermatozoide en las regiones caput, corpus y cauda del epidídimo de ratón

Test SCD

El DFI de los espermatozoides de la región *caput* del epidídimo es superior y significativamente distinto (ANOVA y corrección de Bonferroni, $p < 0.05$) del de los espermatozoides de las regiones *corpus* y *cauda* (**Tabla 28**). La proporción de núcleos espermáticos con daño de ADN disminuye a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo (**Figura 59**)

Tinción con cromomicina A3

No se encontraron diferencias significativas en el nivel de espermatozoides CMA3+ entre las regiones del epidídimo *caput*, *corpus* y *cauda* (**Tabla 28**). Los espermatozoides de ratón recogidos en las distintas regiones del epidídimo presentan un nivel de protaminación similar (**Figura 59**).

Tinción con azul de anilina

La proporción de espermatozoides AB+ no presentó diferencias significativas entre las tres regiones del epidídimo analizadas (**Tabla 28**). La mayoría de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo analizadas eran maduros y morfológicamente normales (**Figura 59**).

5.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.

Test SCD sobre espermatozoides de caballo

Cuando los espermatozoides de caballo se procesan con el test SCD modificado, se originan dos tipos de núcleos espermáticos: algunos espermatozoides liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa, mientras que otros, producen halos de dispersión de la cromatina muy pequeños (**Figura 60**).

La presencia de roturas en los núcleos espermáticos se validó mediante la incorporación directa de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. De acuerdo con el nivel de incorporación de nucleótidos en el ensayo, se encontraron dos tipos de espermatozoides: nucleoides con ausencia de incorporación de nucleótidos marcados y nucleoides con intensa incorporación de nucleótidos marcados en los halos de dispersión de los bucles de ADN (**Figura 61**). De manera que en el ensayo SCD, los espermatozoides con grandes halos de cromatina dispersa, tienen el ADN nuclear fragmentado, mientras que aquellos espermatozoides con halos de dispersión de la cromatina pequeños, tienen el ADN nuclear intacto. De acuerdo con este criterio, se calculó el índice de fragmentación de 19 caballos usando las dos técnicas, el test SCD y el ensayo ISNT. El índice de fragmentación medio calculado mediante el test SCD (media \pm error estándar) ($10,35\% \pm 1,95\%$) resultó ser similar al obtenido mediante el ensayo ISNT ($11,11\% \pm 2,27\%$). No se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p>0,05$) en los índices de fragmentación calculados por estas técnicas en ninguna de las 19 muestras analizadas (**Figura 62**).

La metodología básica proporcionada en el kit comercial Sperm-*Equus*-Halomax, permite, además de una estimación directa del índice de fragmentación de una muestra en microscopía óptica, la visualización de las roturas de ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. Los resultados obtenidos muestran que el test SCD permite el análisis rutinario del DFI de muestras de espermatozoides de caballo, así como la investigación básica y clínica en este tema en el laboratorio de análisis seminal.

Comparación de los parámetros indicadores de la calidad seminal en muestras frescas y descongeladas

Los parámetros motilidad e integridad de membrana plasmática, medidos en muestras de semen fresco y descongelado, presentaron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$). También se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) en la morfología de las muestras frescas y descongeladas. Los valores de estos parámetros en semen fresco son superiores a los de las muestras congeladas (**Tabla 29, Figura 63**). Los resultados indican que el proceso de congelación, almacenado y descongelación, afecta negativamente a la motilidad, la integridad de la membrana plasmática y a la morfología de los espermatozoides de caballo.

Comparación del DFI con otros parámetros indicadores de la calidad seminal

El DFI se calculó exclusivamente en las muestras descongeladas y este parámetro correlaciona de manera negativa y estadísticamente significativa (Rho Spearman, $p < 0,05$) con la motilidad, la morfología normal y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de las muestras de semen fresco y descongelado estudiadas (**Tablas 30 y 31**).

Comparación del DFI y otros parámetros indicadores de la calidad seminal con la tasa de embarazo y el n° de servicios por embarazo

La tasa de embarazo conseguida correlaciona de manera estadísticamente significativa (Rho Spearman, $p < 0,05$) y positiva con la motilidad, la morfología normal y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de la muestra usada. Además, esta tasa, tiene una correlación negativa y significativa (Rho Spearman, $p < 0,05$) con el DFI calculado, con altos valores de DFI asociados a un número bajo de embarazos tras inseminación artificial (**Tablas 30 y 31**).

El número de servicios por embarazo correlaciona de manera negativa y estadísticamente significativa (Rho Spearman, $p < 0,05$) con la motilidad, la morfología normal y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de la muestra usada. Además, esta tasa tiene una correlación positiva y significativa (Rho Spearman, $p < 0,05$) con el DFI

calculado, con altos valores de DFI asociados a un número elevado de servicios por embarazo (Tablas 30 y 31).

Comparación del DFI del grupo de caballos con fertilidad alta y baja

Las 23 muestras de semen de caballo estudiadas se dividieron en dos grupos, de alta (n=16) y baja fertilidad (n=7) de acuerdo con los criterios establecidos por Dowset y Pattie en 1982. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos establecidos en los siguientes parámetros: morfología, integridad de la membrana plasmática e índice de fragmentación (Tabla 32, Figura 64). Se encontraron también diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en la tasa de embarazo y el número de servicios por embarazo (Tabla 32). Los resultados indican que los caballos pertenecientes al grupo de fertilidad alta poseen un DFI significativamente (U Mann Whitney, $p < 0,05$) inferior al del grupo de caballos con fertilidad baja (Tabla 32). El test SCD proporciona una prueba sencilla para evaluar el daño de ADN presente en una muestra de semen y parece un buen indicador que podría ser usado en el análisis de la fertilidad.

5.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN.

Test SCD sobre espermatozoides de oveja

Cuando los espermatozoides de oveja se procesan con el test SCD modificado, se originan dos tipos de núcleos espermáticos: algunos espermatozoides liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa, mientras que otros, producen halos de dispersión de la cromatina muy pequeños (Figura 65).

La presencia de roturas en los núcleos espermáticos se validó mediante la incorporación directa de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. En este ensayo se confirma que los espermatozoides con grandes halos de cromatina dispersa tienen su ADN nuclear fragmentado, mientras que aquellos espermatozoides con halos de dispersión de la cromatina pequeños, tienen su ADN nuclear intacto (Figura 66). De

acuerdo con este criterio, se calculó el índice de fragmentación de una muestra representativa de 70 ovejas. Los niveles basales de fragmentación de ADN van de 1% a 40,67% con una media \pm error estándar de 5,94% \pm 0,77%. Además, se calculó el índice de fragmentación de ADN de 20 ovejas usando las dos técnicas, el test SCD y el ensayo ISNT, los resultados se muestran en la **Figura 67**. El índice de fragmentación medio calculado mediante el test SCD (media \pm error estándar) (7,26% \pm 2,19%) resultó ser similar al obtenido mediante el ensayo ISNT (8,06% \pm 2,01%). No se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p > 0,05$) en los índices calculados por estas técnicas en ninguna de las 20 muestras analizadas.

El protocolo del test SCD modificado para ser utilizado sobre espermatozoides ovinos permite, además de una estimación directa del índice de fragmentación de una muestra en microscopía óptica, la visualización de las roturas de ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados usando la ADN polimerasa I en un ensayo de *In Situ* Nick Translation. El test SCD permite el análisis rutinario del DFI de muestras de espermatozoides de oveja, así como la investigación básica y clínica en este tema en el laboratorio de análisis seminal.

Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN

El rango de DFI observado en el grupo control 1 (Enero a Junio) iba desde individuos con 1% hasta otros con más del 40%. El valor medio del DFI en este periodo fue (media \pm error estándar) 6,40% \pm 1,30% (**Tabla 33**).

Los animales estudiados entre Octubre y Diciembre (grupo control 2) mostraron una distribución de valores de DFI similar (5,71% \pm 0,75%) a los del grupo control 1 (**Tabla 33**). No se obtuvieron diferencias significativas entre ambos periodos de análisis.

La condición del DFI de los grupos de individuos 20 y 40 días después de la vacunación fue muy distinta. El DFI 20 días después de la vacunación (VG1) con un valor medio de 63,42% \pm 3,35% aumentó de manera significativa (ANOVA, corrección de Bonferroni, $p < 0,05$) con respecto a los grupos control (**Tabla 33, Figuras 68 y 69**). En el grupo de 40 días después de la vacunación (VG2), el DFI (21,72% \pm 4,22%) disminuyó significativamente (ANOVA, corrección de Bonferroni, $p < 0,05$) con respecto al DFI del grupo VG1. El índice de fragmentación medio

calculado en este grupo VG2 es además significativamente superior al de los dos controles utilizados (ANOVA, corrección de Bonferroni, $p < 0,05$) (**Tabla 33, Figura 69**).

En conclusión, la vacunación aumenta de manera temporal el índice de fragmentación de ADN de los espermatozoides ovinos. El incremento del DFI tras la vacunación se restaura alcanzando los niveles normales a partir de los 40 días después de la vacunación. Este aumento de la fragmentación del ADN ha de ser considerado a la hora de usar muestras de semen recogidas de animales vacunados para reproducción artificial, pues podrían ver disminuida su capacidad fecundante.

5.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales

El ensayo cometa 2D

El ensayo cometa 2D produce migración de fragmentos de ADN en dos ejes. La migración en el eje X (de derecha a izquierda), corresponde a la primera electroforesis (neutra), en la que el ADN migra en una conformación de cadena doble. La migración en el eje Y (de arriba a abajo) corresponde a la segunda electroforesis (alcalina), en la que el ADN migra en una conformación de cadena sencilla. Los tipos de cometa 2D obtenidos en cada una de las especies estudiadas siguen el mismo patrón que los representados en la **Figura 24**. En el caso de las muestras de marsupiales estudiadas, es llamativo observar la ausencia, en todos los casos, de espermatozoides con daño doble basal (**Figuras 70 a, 71 a, 72**). Se descartó la posibilidad de que esta ausencia fuera resultado de la incapacidad del ensayo cometa 2D para detectar este tipo de daño en estas especies, pues cuando los espermatozoides de koala y canguro se trataron con un agente productor de roturas de cadena doble como es la enzima de restricción Alu I, aparecieron en la preparación núcleos espermáticos con una cola de migración en el eje X (daño de ADN de cadena doble) (**Figuras 70 b y 71 b**). El ensayo cometa 2D en estas especies es, por tanto, capaz de detectar las roturas dobles así que parece que los espermatozoides de koala, canguro y wombat carecen de daño de ADN de cadena doble basal en las muestras de semen normales.

Tratamiento con H₂O₂

Dos muestras de semen de dos individuos diferentes de cada una de las seis especies analizadas se trataron de manera independiente con concentraciones crecientes de H₂O₂, un productor activo de roturas de ADN de cadena sencilla. Los resultados expresados como la frecuencia de células con el ADN fragmentado se muestran en la **Tabla 34**.

Tanto en las muestras espermáticas correspondientes a las especies del grupo Metatheria como en las de las especies del grupo Eutheria, la frecuencia de espermatozoides con daño de ADN de cadena sencilla (DFI ss) aumentó con la concentración de H₂O₂. En las muestras de marsupiales, el DFI ss fue significativamente superior (ANOVA, $p < 0,05$) al de las muestras de placentarios analizadas, en todas las dosis de H₂O₂ probadas. La menor dosis, no produjo ningún efecto sobre los espermatozoides de las especies del grupo Eutheria (**Figura 73 a**). Estos resultados confirmaron que los núcleos espermáticos de las especies de mamíferos de la infraclass Eutheria son más estables que los de las especies de la infraclass Metatheria.

En las especies del grupo Eutheria analizadas, es llamativo el caso de los espermatozoides de cerdo, cuyo DFI se mantuvo invariable independientemente del nivel de exposición al H₂O₂, salvo en la dosis más alta (**Figura 73 a**). Estos resultados sugieren que los espermatozoides de cerdo son más resistentes al daño de ADN por estrés oxidativo que los espermatozoides del resto de los placentarios analizados. Esta estabilidad nuclear podría estar relacionada con la cantidad de residuos de cisteína, susceptibles de formar puentes disulfuro, presentes en las protaminas (**Figura 73 b**). De hecho, en las especies analizadas, el número de cisteínas presentes en la protamina 1 de los espermatozoides (**Figura 74**) resultó ser inversamente proporcional al efecto nocivo del H₂O₂ (**Figura 75**).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides humanos

Cuando los espermatozoides humanos se exponen a la solución desnaturalizante y posteriormente a la solución de lisis desproteinizante incluidas en el kit Halosperm, es posible apreciar distintos patrones de dispersión del ADN. Cada uno de estos patrones corresponde, de acuerdo con los resultados del ensayo DBD-FISH realizado, a distintos niveles de roturas de ADN. Se observa que los espermatozoides con halos grandes de dispersión del ADN muestran niveles de marcaje en DBD-FISH muy débiles, e incluso indetectables, en áreas nucleares específicas. Estas áreas probablemente correspondan a regiones de agrupación de secuencias de ADN satélite repetitivas, que son muy sensibles a la desnaturalización (Cortés-Gutierrez y col., 2008). Los espermatozoides con halo de tamaño mediano, presentan un ligero aumento de la señal de DBD-FISH con respecto a los núcleos con halo grande. En contraste, los núcleos de espermatozoides con halos de tamaño pequeño o sin halo, muestran un marcaje de DBD-FISH muy fuerte, correspondiente a un nivel de daño de ADN alto (Fernández y col., 2003; Fernández y col., 2005). De esta manera se determina, en cada nucleoide, el nivel de roturas de ADN en relación al tamaño del halo de dispersión. Se demuestra que los nucleoides que presentan un halo de dispersión grande o mediano se pueden considerar espermatozoides con el ADN intacto, mientras que aquellos que presentan un halo pequeño, o ausencia de halo, poseen el ADN nuclear fragmentado. Es particularmente llamativo el tipo de espermatozoides degradado, que representa un nivel de daño de ADN extremo. Este daño parece que afecta no sólo al ADN sino también a las proteínas de la matriz nuclear. También se visualizan en la preparación nucleoides grandes, sin cola que no corresponden a espermatozoides y que podrían ser espermátidas, leucocitos u otras células no germinales.

La estructura de bucles de ADN unidos a una matriz había sido observada anteriormente por Cook y col. en 1976. Probablemente, la desnaturalización de las roturas de ADN y la posterior desproteinización de los núcleos espermáticos desorganice la cromatina de los espermatozoides de manera diferente en el caso de los núcleos con el ADN fragmentado e intacto de manera que la estructura toroidal descrita por Ward (1993) podría verse modificada por efecto de la desproteinización. Probablemente, en los espermatozoides con el ADN intacto,

se liberen los bucles de ADN presentes en los toroides quedando dispuestos alrededor de una estructura proteica residual correspondiente a la matriz nuclear. En el caso de los espermatozoides fragmentados, estos bucles se liberarían del mismo modo junto con los fragmentos de ADN presentes en ellos, de manera que los fragmentos se expandirían en torno al *core* dispersándose de forma más irregular. Cuando previamente a una lisis desproteinizante, los espermatozoides se exponen a una solución ácida, la respuesta de los núcleos espermáticos es distinta. En el caso de los núcleos con el ADN intacto, la desnaturalización y posterior desproteización produciría la liberación de los bucles de ADN de manera similar a la descrita en el caso anterior. En el caso de los núcleos con el ADN fragmentado, la solución ácida podría provocar que los extremos de las roturas hicieran *crosslinking* con las proteínas, impidiendo la liberación de los bucles tras la desproteización y dando lugar a estructuras sin halo o con halos muy pequeños. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el caso del tratamiento ácido-lisis los núcleos espermáticos sin halo o con halo pequeño sean el resultado de una liberación extrema de los fragmentos de ADN presentes en los mismos, tan masiva y expandida que estos fragmentos serían indetectables mediante las tinciones realizadas, los halos de dispersión de fragmentos serían tan grandes y estarían tan dispersos que se difuminarían en el fondo de la preparación.

Aunque los distintos tipos de espermatozoides pueden identificarse visualmente de manera sencilla, el uso de un programa informático de análisis de imagen puede facilitar la determinación del índice de fragmentación de ADN de una muestra. Cada uno de los tipos de espermatozoide, establecidos de acuerdo con la morfología del halo, se analizó visualmente y mediante análisis de imagen digital en dos y tres dimensiones. Los dos sistemas de análisis digital permitieron la clasificación de los espermatozoides en cada uno de los tipos celulares establecidos *de visu*. El análisis de imagen de muestras de espermatozoides procesados con el test SCD usando tanto el soporte informático *Leica Qwin Pro* como *Volocity*, proporciona un sistema cuantitativo y objetivo para medir el daño de ADN en dos y tres dimensiones respectivamente. Esta herramienta podría mejorarse y unirse a un microscopio automático constituyendo así un sistema autónomo para cuantificar el nivel y el tipo de daño en un gran número de espermatozoides.

En conclusión, el test SCD permite la determinación de los niveles de fragmentación de ADN de una muestra de espermatozoides humanos de manera sencilla, fiable y a un bajo coste, lo cual hace que se pueda utilizar de forma rutinaria. Además, es un procedimiento muy versátil que puede combinarse con FISH, incubación con anticuerpos y tinciones para detectar la proteína residual (De la Torre y col., 2007), permitiendo de esta manera relacionar la fragmentación del ADN con la presencia de aneuploidías cromosómicas (Muriel y col., 2007), nivel de metilación y cantidad de daño de ADN presente en cromosomas, regiones de cromosomas o genes específicos.

6.2 La fragmentación del ADN de espermatozoides de pacientes con varicocele

Es interesante comprobar que los resultados obtenidos confirman lo que ya algunos estudios habían demostrado, que el nivel de daño de ADN de los espermatozoides de los pacientes con problemas de fertilidad de diferente etiología, es superior al de los hombres fértiles (Host y col., 1999; Zini y col., 2001). En este caso, el DFI del grupo de hombres fértiles es casi dos veces superior al del grupo de pacientes infértiles, haciendo, una vez más, relevante el análisis del parámetro integridad del ADN para la valoración de la calidad de una muestra de semen. Además, como algunos trabajos recientes han constatado (Saleh y col., 2003b; Chen y col., 2004), los resultados confirman que las muestras de pacientes con varicocele contienen una proporción de células con ADN fragmentado significativamente superior a las de los hombres fértiles. El porcentaje medio de espermatozoides con el ADN fragmentado en pacientes con varicocele, determinado mediante SCSA, es 25% (Saleh y col., 2003b) cerca del 23% obtenido mediante TUNEL (Chen y col., 2004). Los resultados obtenidos en este estudio usando el test SCD confirman estas observaciones. Sin embargo, en las muestras de pacientes con varicocele analizadas, se detectó una proporción de espermatozoides fragmentados ligeramente más elevada (32,4%) que las observadas usando otras técnicas. Esto podría reflejar una mayor sensibilidad del test SCD comparado con otras metodologías para detectar células con ADN fragmentado (Fernández y col., 2005).

Por otro lado, la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en las muestras de pacientes con varicocele analizadas, no presentó diferencias significativas con las de los otros dos grupos de pacientes infértiles estudiados (Saleh y col., 2003b). Tampoco se encontraron

diferencias significativas en el DFI calculado en el grupo de pacientes normozoospermicos y el grupo de pacientes con parámetros seminales anormales. Esta ausencia de diferencias debería considerarse en términos relativos, pues en un estudio anterior, realizado también con el test SCD (Fernández y col., 2005), se encontró que los pacientes oligoastenoospermicos mostraban un DFI significativamente superior al de los pacientes normozoospermicos. Esto sugiere que el grupo con parámetros seminales anormales es muy heterogéneo y probablemente las muestras con anomalías más intensas y combinadas podrían tener más frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado. De manera que las diferencias en el DFI deberían encontrarse dependiendo de la contribución relativa de ciertos subgrupos al grupo total de pacientes con parámetros seminales anormales.

Como se ha dicho, no se encontraron diferencias en la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado entre las muestras analizadas de pacientes con varicocele y el resto de los pacientes infértiles, sin embargo, la proporción relativa de espermatozoides extremadamente dañados (degradados) en el total de espermatozoides fragmentados resultó ser superior en el grupo de pacientes con varicocele comparado con el resto de los grupos analizados. Esta proporción parece baja e independiente del estatus de fertilidad, excepto en el grupo de pacientes con varicocele. En estos pacientes el DDI/DFI es 2-3 veces superior al de los otros tres grupos estudiados. De manera que la determinación de la contribución de los espermatozoides degradados a la población de espermatozoides con ADN fragmentado podría orientar en el diagnóstico del varicocele. Sería interesante incluir el test SCD como prueba complementaria en el estudio diagnóstico de pacientes con varicocele. De la misma manera que se ha propuesto la determinación de los niveles de ROS y la actividad antioxidante total en el semen (Saleh y col., 2003b; Allamaneni y col., 2004). Además, sería muy interesante evaluar si la varicocelelectolemia disminuye la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado como se ha publicado recientemente (Zini y col., 2005a), así como la contribución relativa de los espermatozoides con daño nuclear extremo (degradados) a esta población.

La discriminación de los distintos grados de fragmentación de ADN es una propiedad única del test SCD. Los espermatozoides con el ADN fragmentado pueden presentar: halos pequeños de dispersión de bucles de ADN; no presentar halo pero el *core* teñido fuertemente o, no presentar halo y el *core* teñido de manera suave e irregular. Este modelo gradual refleja un

daño de ADN nuclear progresivamente mayor. En el último tipo, el degradado, parece que el daño afecta no sólo al ADN sino también a las proteínas, especialmente a las de la matriz nuclear pues bajo el protocolo del SCD inicial, aparecen pequeños fragmentos pulverizados (Fernández y col., 2003).

Dentro de la población de espermatozoides con el ADN fragmentado, la contribución de las células con halo pequeño y sin halo (y con el *core* bien teñido) es similar entre los 4 grupos. Sin embargo, 1 de cada 4 células con ADN fragmentado pertenece al tipo degradado en las muestras de pacientes con varicocele. Esto duplica la proporción observada en los pacientes normozoospermicos, los pacientes con parámetros seminales anormales y los hombres fértiles. En estos grupos se encontró que alrededor de 1 de cada 9 células con ADN fragmentado tenía un nivel de daño de ADN extremo. Aunque la frecuencia media de espermatozoides con el ADN fragmentado es casi dos veces mayor en hombres infértiles que en hombres fértiles, la proporción relativa de espermatozoides con daño extremo de ADN en el total de espermatozoides fragmentados parece ser baja en todos los grupos, salvo en el de los pacientes con varicocele.

La naturaleza del daño en los espermatozoides degradados ha de estar relacionada con una exposición fuerte y prolongada a factores productores de daño de ADN. La excesiva producción de espermatozoides degradados, con un alto nivel de daño de ADN, en los pacientes con varicocele, parece ser el resultado de la exposición de las células espermáticas al entorno de alta temperatura y estrés oxidativo característico de esta patología. Varios estudios han determinado el aumento de la temperatura testicular en los pacientes que sufren varicocele (Zorgniotti y Macleod, 1973; Goldstein y Eid, 1989). Además se ha observado que la varicocele normaliza las temperaturas escrotales y la calidad seminal (Pryor y Howards, 1987; Saleh y col., 2003b; Schlesinger y col., 1994). Yamaguchi y col. demostraron en 1989 que los pacientes con varicocele tienen niveles altos de fragmentación de ADN y concentraciones de ROS en el plasma seminal elevadas. Y estudios más recientes han correlacionado el aumento en los niveles seminales de ROS con el grado del varicocele (Allamaneni y col., 2004).

En este estudio se ha tratado de reproducir *in vitro* el ambiente desfavorable al que están sometidos los espermatozoides en este tipo de pacientes. Los resultados indican que tanto la

temperatura elevada como el estrés oxidativo tienen un efecto negativo sobre la integridad del ADN de los espermatozoides humanos. Se observa un aumento progresivo del índice de fragmentación de ADN por efecto de la temperatura, así como un ascenso significativo del índice de degradación en etapas avanzadas del proceso. Además, cuando las muestras de semen se someten a concentraciones crecientes de H_2O_2 , el índice de fragmentación de ADN aumenta también de manera significativa y mostrando un efecto dosis-respuesta. Lo mismo ocurre en el caso del índice de degradación en las fases más avanzadas.

Las diferencias observadas en la dinámica de la fragmentación y de la degradación espermática a 34 y 37°C, podrían explicar la considerablemente mayor frecuencia de espermatozoides degradados en pacientes con varicocele, cuya temperatura testicular es 37°C frente a los 34°C intratesticulares normales (Goldstein y Eid, 1989). Además, la aceleración del proceso de fragmentación y degradación *in vitro* observado en la incubación de muestras a concentraciones de H_2O_2 crecientes en comparación con el control podría, de la misma manera, explicar la alta frecuencia de espermatozoides degradados de los pacientes con varicocele. La combinación de estos dos factores, alta temperatura y estrés oxidativo, síntomas característicos del varicocele, durante un periodo largo de tiempo, parecen ser responsables de la aparición del elevado porcentaje de espermatozoides degradados en pacientes con esta patología.

Varios trabajos han demostrado que el calor y estrés oxidativo deterioran el ADN espermático (Rockett y col., 2001; Agarwal y col., 2003; Banks y col., 2005; Fernández y col., 2005; Paul y col., 2008). La función testicular normal depende de la temperatura (Fukui, 1923; Moore y Quick, 1924) y en la mayoría de los mamíferos los testículos se mantienen entre 2 y 8°C por debajo de la temperatura corporal (Harrison y Weiner, 1948; Ivell, 2007). La idea de que un aumento en la temperatura testicular resulta en una espermatogénesis anormal está ampliamente documentada. La contracepción mediante el uso del calentamiento genital se ha demostrado usando baños calientes (Mieusset y Bujan, 1994). El enfriamiento escrotal y testicular se ha propuesto en el pasado como terapia para mejorar la calidad seminal (Davidson, 1954; Frankenhuys y Wensing, 1979; Mulcahy, 1984). Además, los hombres con temperaturas escrotales por encima de la normalidad se ha observado que presentan: concentración espermática reducida (Mieusset y Bujan, 1995), aumento en la incidencia de espermatozoides anormales o inmaduros, tasas elevadas de sub o infertilidad (Wang y col., 1997) y una elevada

frecuencia de espermatozoides con fragmentación de ADN (Saleh y col., 2003b; Chen y col., 2004). En ratones, el estrés calórico resulta en pérdida de células germinales, mala calidad seminal, integridad de ADN alterada, empaquetamiento anormal de la cromatina, tasas de fecundación y embarazo reducidas y pérdida embrionaria temprana (Rockett y col., 2001; Banks y col., 2005; Paul y col., 2008). Finalmente varios estudios han mostrado cambios en la expresión genética tras estrés calórico, especialmente se ha observado un descenso significativo en la expresión de proteínas implicadas en la detección y reparación del daño de ADN (Tramontano y col., 2000; Rockett y col., 2001; Schreiber y col., 2002).

Por otro lado, el varicocele también produce altos niveles de ROS que resultan en estrés oxidativo. Estas ROS cuando están presentes en concentraciones limitadas se cree que juegan un rol fisiológico importante durante la capacitación espermática (Aitken y Fisher, 1994; De Lamirande y Gagnon, 1995). Sin embargo, a altas concentraciones, las ROS dan lugar a disfunción espermática y daño de ADN oxidativo (Kodama y col., 1997; Aitken y col., 1998; Lopes y col., 1998a; Barroso y col., 2000). El óxido nítrico liberado por las células endoteliales de las venas espermáticas dilatadas y el peroxinitrito generado por su reacción con el radical superóxido son probablemente fuentes importantes responsables del alto nivel de estrés oxidativo del varicocele (Mitropoulos y col., 1996; Romeo y col., 2001; Turkyilmaz y col., 2004). La fragmentación de ADN podría ser una expresión directa de ese daño oxidativo o una consecuencia provocada por un proceso similar al apoptótico por la superproducción de ROS.

De manera que el elevado nivel de espermatozoides con el ADN degradado detectado en los pacientes con varicocele debe ser el resultado de la combinación de varios factores: la temperatura testicular elevada característica de esta patología y el estrés oxidativo resultante de la elevada producción de ROS también descrita en esta enfermedad. Puesto que se ha observado que *in vitro*, la incubación prolongada de espermatozoides pertenecientes a individuos normozoospermicos, en condiciones de estrés calórico y oxidativo produce un aumento llamativo del índice de fragmentación en primera instancia y del índice de degradación en las etapas avanzadas.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que los pacientes con varicocele presentan una tasa de espermatozoides degradados, espermatozoides con un alto nivel de

daño, superior a la del resto de grupos analizados. Esto muestra la importancia de analizar distintos niveles de daño de ADN a nivel celular y la utilidad del test SCD a la hora de revelarlos. La naturaleza del daño de ADN nuclear de estos espermatozoides degradados parece ser el resultado de una exposición intensa y prolongada a alta temperatura, estrés oxidativo o a una combinación de ambos.

6.3 El ensayo cometa en dos dimensiones en espermatozoides humanos

La metodología que se presenta en este trabajo permite distinguir la cantidad y el tipo de daño de ADN presente en el mismo espermatozoide humano. Este ensayo produce la migración del ADN en dos ejes. La migración en el eje X corresponde a la primera electroforesis (neutra) en la que el ADN migra en una conformación de cadena doble. La migración en el eje Y corresponde a la segunda electroforesis (alcalina) en la que el ADN migra en una conformación de cadena sencilla. Es llamativo observar que el aspecto de las colas de los cometas es diferente según sean resultado de la lisis neutra o alcalina. La cola de los cometas neutros (eje X) es más compacta, y está unida a la cabeza del cometa en los niveles de daño de ADN bajos; mientras que, la cola de los cometas alcalinos (eje Y) es más dispersa y está más separada de la cabeza, incluso en los niveles de daño bajos. Klaude y col. en 1996 describen estructuras similares. Esta morfología responde a la organización del ADN en las colas de los cometas de uno y otro tipo. Las colas de los cometas obtenidas como resultado de la lisis neutra del ensayo (eje X) están constituidas por bucles de ADN extendidos unidos a estructuras nucleares localizadas en la cabeza del cometa, mientras que las colas de los cometas de la lisis alcalina (eje Y) están constituidas por fragmentos de ADN libres. A esta misma conclusión llegan Shaposhnikov y col. (2008) en un trabajo reciente utilizando hibridación *in situ* fluorescente. Las señales de hibridación obtenidas en los cometas alcalinos son distintas de las de los cometas neutros indicando que la organización del ADN en las colas de estos cometas es diferente. Confirman que los cometas neutros están constituidos por bucles de ADN y que las colas de los cometas alcalinos están formadas por fragmentos de ADN libres.

Cuando se usan dosis altas de radiación, Klaude y col. (1996) comprueban que la cola de los cometas neutros se comporta de manera similar a la de los cometas alcalinos y sugieren, por tanto, que ha de estar constituida por fragmentos de ADN procedentes de las roturas de cadena

doble. Esto explicaría porqué en el caso de los cometas 2D con niveles altos de roturas de cadena sencilla y doble, ambas colas están separadas de la cabeza, en contra de la continuidad de las colas neutras en los cometas con bajo nivel de daño. En los cometas con niveles bajos de daño, más que la migración de fragmentos de ADN, lo que debe ocurrir es que las hebras del ADN unidas a la cabeza del cometa se estiran por efecto de la electroforesis. A medida que el número de roturas aumenta, se producen fragmentos de ADN que migran libremente en la cola (Fairbairn y col., 1995).

La detección de roturas de ADN de cadena sencilla y doble fue descrita por primera vez por Rydberg y Johanson en 1978, que utilizaron la tinción con naranja de acridina para identificar roturas de cadena doble y sencilla en células inmersas en un microgel de agarosa lisadas en condiciones alcalinas. La cantidad de roturas de ADN de cadena doble y sencilla se determinó mediante el cálculo de la proporción de fluorescencia verde y roja. En otro trabajo posterior, en el que la tinción con naranja de acridina se usó sobre cometas alcalinos (Collins y col., 1997), se observó que las colas de cometa emitían fluorescencia roja y las cabezas, fluorescencia verde. Se sugirió que en el ADN de la cabeza, tras la lisis alcalina y la electroforesis, los bucles se mantenían intactos, de manera que las dos hebras podían unirse de nuevo fácilmente. No así los fragmentos de la cola. En el ensayo cometa 2D el uso de la tinción con naranja de acridina confirma la presencia independiente de ADN de cadena sencilla y doble en cada una de las colas. La proximidad de las hebras en el caso de las roturas de cadena doble, bien porque los bucles se mantienen intactos o bien porque los fragmentos migran juntos, permite la renaturalización de las cadenas de ADN. En el caso de los fragmentos de ADN de cadena sencilla esta renaturalización no es posible.

Varios trabajos se han publicado hasta la fecha usando la electroforesis en gel en dos dimensiones. Klaude y col. (1996) en su trabajo usan condiciones neutras o alcalinas en ambas electroforesis para demostrar la presencia de fragmentos o bucles de ADN en las colas de los cometas de cada una de las versiones del ensayo pero no combinan, como en este estudio, las dos versiones en una misma prueba. En otro trabajo realizado por Fernández y col. (2001), se presenta un ensayo en dos dimensiones similar, capaz de cuantificar de manera simultánea en la misma célula roturas de ADN de cadena sencilla y doble y sugiere la correspondencia de cada

una de las colas con la presencia de roturas de ADN de uno u otro tipo pero sin demostrar el fundamento de la prueba.

El ensayo cometa 2D supone un paso adicional en la evaluación del daño pues consigue discriminar de manera clara la cantidad y el tipo de roturas de ADN, de cadena doble y sencilla, de una misma célula. Las roturas de cadena doble se consideran en general más relevantes, en términos biológicos, que las de cadena sencilla (Khanna y Jackson, 2001). Su reparación es más compleja y se ha descrito, en células somáticas, que pueden provocar alteraciones cromosómicas como inversiones, traslocaciones, deleciones, cromosomas dicéntricos y formación de micronúcleos (Bryant, 1984; Natarajan y Obe, 1984; van Gent y col., 2001). Ninguno de los métodos disponibles actualmente para la evaluación de la fragmentación del ADN es capaz de establecer una distinción entre las roturas de cadena sencilla y doble en la misma célula. Quizá determinadas proporciones de uno o ambos tipos de daño estén asociadas con problemas de fertilidad. El establecimiento de los distintos tipos de espermatozoides con distintos niveles y tipos de daño presentados en este estudio podría ayudar a identificar cuáles son los responsables de los problemas de fertilidad. El ensayo cometa 2D podría resolver parte del debate científico actual en torno a la influencia de la fragmentación del ADN en el embarazo y la fertilidad.

Aunque es posible cuantificar el daño de ADN de los cometas sin el uso de programas informáticos de análisis de imagen, simplemente discriminando grados de daño de acuerdo con la apariencia del cometa, es bastante habitual el uso de soportes informáticos. Los parámetros que se miden habitualmente con el uso de estos programas son: la longitud de la cola del cometa, la intensidad de fluorescencia relativa del ADN de la cabeza y la cola, y el momento de la cola. En el presente estudio se miden varios parámetros indicadores del tamaño del cometa y de la intensidad de fluorescencia tanto de la cabeza como de la cola, estableciendo valores independientes de cada uno de estos parámetros en cada tipo de cometa. La ventaja de usar este sistema es que los valores de los parámetros medidos pueden asociarse a una morfología de cometa determinada. No todas las variables son capaces de esto, por ejemplo, el momento de la cola, que consiste en el producto de la longitud de la cola por la intensidad de la misma, a pesar de ser un método de cuantificación muy popular, no proporciona una indicación clara del aspecto de los cometas (Collins, 2002). El análisis de imagen de espermatozoides procesados

con el ensayo cometa 2D usando el soporte informático *Leica Qwin Pro* proporciona un sistema cuantitativo y objetivo para medir el daño de ADN. Esta herramienta podría mejorarse y unirse a un microscopio automático permitiendo así un sistema autónomo para cuantificar el nivel y el tipo de daño en un gran número de espermatozoides.

En definitiva, el ensayo cometa 2D tiene la capacidad de evaluar distintos niveles y tipos de daño de ADN en un mismo espermatozoide. El ensayo cometa unidimensional se considera una de las técnicas más sensibles para medir roturas. La variante presentada en este trabajo proporciona un análisis más profundo, no sólo de la cantidad, sino también de la cualidad del daño de ADN. La combinación del ensayo cometa 2D con FISH permitiría localizar cromosomas, regiones de cromosomas o genes específicos en el cometa y, por tanto, determinar la cantidad y el tipo de daño de ADN presente en estas regiones (Santos y col., 1997; McKelvey-Martin y col., 1998; Rapp y col., 2000). Además, esta técnica podría adaptarse para evaluar distintos tipos de daño de ADN en otros tipos celulares.

6.4 La fragmentación del ADN de espermatozoides humanos como indicador de la fertilidad en Reproducción Asistida

En la primera parte del estudio se ha tratado de relacionar la integridad del ADN espermático con los parámetros seminales habituales y el éxito o fracaso de embarazo en inseminación artificial intrauterina mediante el análisis de muestras seminales antes y después de la recuperación espermática. Los resultados obtenidos muestran que los dos métodos de preparación de espermatozoides utilizados, presentan una capacidad de recuperación de espermatozoides móviles similar y son igualmente eficaces a la hora de eliminar espermatozoides fragmentados (SCD), degradados y espermatozoides con daño de ADN de cadena doble. Es llamativo comprobar que la centrifugación en gradiente de densidad produce recuperados de espermatozoides con un porcentaje de roturas de cadena sencilla inferior al *swim up*. Esto puede ser debido a que el protocolo de centrifugación en gradiente de densidad utilizado es una combinación de la técnica de recuperación por gradientes convencional y el *swim up*, de manera que se trata de un método con mayor capacidad de filtro. Los espermatozoides son doblemente seleccionados, primero por el gradiente y a continuación por el *swim up*, así que parece lógico pensar que esta selección de espermatozoides más exhaustiva

tenga la capacidad de recuperar espermatozoides con menor daño de ADN de cadena sencilla. Muchos trabajos anteriores han obtenido resultados similares, en el sentido de que las técnicas de centrifugación en gradiente de densidad y *swim up* son igual de efectivas seleccionando espermatozoides funcionales para reproducción asistida (Tanphaichitr y col., 1988; Morales y col., 1991; Ng y col., 1992). Otros trabajos, sin embargo, afirman que las técnicas de recuperación no mejoran la integridad del ADN de las muestras (Younglai y col., 2001; Stevanato y col., 2008). Algunos comprueban que las técnicas de recuperación que implican centrifugación no seleccionan espermatozoides con mayor integridad de ADN y están asociadas con la generación iatrogénica de ROS que como consecuencia produce niveles altos de daño de ADN en las muestras recuperadas (Twigg y col., 1998a; Zini y col., 2000). En el caso del *swim up*, la mayoría de los trabajos coinciden en afirmar que mediante el uso de esta técnica se consigue un descenso significativo en el DFI y una eliminación eficiente de los espermatozoides con altos niveles de daño de ADN (Spano y col., 1999; Younglai y col., 2001; Zini y col., 2000). Quizá el *swim up* que sigue a la centrifugación en gradiente de densidad aplicada en este trabajo tenga algo que ver en la eficacia de la recuperación espermática de esta técnica en términos de fragmentación de ADN.

De acuerdo con las características seminales, se observó una relación negativa entre la motilidad, la morfología, la concentración y el nivel de fragmentación de ADN calculado mediante el test SCD. Se encontraron diferencias significativas en el DFI y el DDI de ADN entre el grupo de muestras normozoospermicas y el grupo de muestras con parámetros seminales anormales. Las muestras normozoospermicas tenían un DFI y DDI significativamente inferior que las no normozoospermicas. Estos resultados están de acuerdo con la literatura y confirman que la calidad espermática está asociada con la fragmentación de ADN (Irvine y col., 2000; Tomlinson y col., 2001).

Cuando se relaciona el éxito o fracaso de embarazo con la calidad seminal, los resultados indican que las muestras recuperadas con éxito de embarazo en IUI presentan una concentración de espermatozoides significativamente superior a la de las muestras con fracaso de embarazo en IUI. Varios estudios anteriores habían obtenido resultados similares (Van der Westerlaken y col., 1998; Khalil y col., 2001). Ambos comprueban que el número de espermatozoides inseminados afecta de manera significativa a la tasa de embarazo. Al valorar la

integridad del ADN de las muestras de semen recuperado empleadas en IUI, no se encontraron diferencias significativas ni en el DFI ni en el DDI calculados mediante el test SCD, ni tampoco en el DFI ss calculado mediante el ensayo cometa 2D, entre las muestras que habían conseguido un embarazo y las muestras que habían fracasado. De manera que no parece que ninguno de los parámetros indicadores de la integridad del ADN calculados tenga valor predictivo del embarazo en IUI. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Muriel y col. en un trabajo anterior (2006) empleando también el test SCD. Sin embargo, Duran y col. (2002) sugieren la existencia de una relación entre la calidad del ADN espermático y el embarazo en IUI, y afirman que la integridad del ADN podría usarse para predecir el embarazo en el tratamiento con IUI.

Un resultado llamativo es que las muestras con éxito de embarazo en IUI presentaron un DFI ds en el recuperado, aunque bajo, significativamente superior a la de las muestras con fracaso de embarazo en IUI. Estas diferencias, aun siendo significativas, han de considerarse en términos relativos, pues se trata de valores de fragmentación muy bajos. Mientras que el grupo de muestras con éxito de embarazo presentó un DFI de $6,56 \pm 2,27\%$, el grupo de muestras que fracasó a la hora de conseguir un embarazo tenía un DFI de $4,81 \pm 0,71\%$. Estas diferencias no parecen tener mucha importancia, sería ilógico pensar que un alto nivel de daño de ADN de cadena doble favoreciera el embarazo.

En conclusión, de acuerdo con los resultados obtenidos, la fragmentación del ADN medida mediante el test SCD, podría ser un buen parámetro indicador de la calidad seminal, pero no parece tener un valor predictivo del embarazo en IUI. Tampoco la integridad de ADN medida con el ensayo cometa 2D puede ser utilizada como tal. Sin embargo, la concentración de espermatozoides en las muestras recuperadas, sí que parece que influye en el embarazo, este parámetro podría utilizarse como indicador del éxito o fracaso de embarazo en IUI.

En la segunda parte del estudio se relaciona la integridad del ADN espermático con el éxito o fracaso de embarazo en FIV/ICSI. Los resultados indican que el índice de fragmentación de ADN, evaluado con el test SCD y con el ensayo cometa 2D, está relacionado con el éxito de embarazo. Las muestras de semen puro que consiguieron un embarazo presentaron un DFI calculado con el test SCD significativamente inferior al de las muestras que no lo consiguieron. El

índice de fragmentación, determinado mediante el test SCD en las muestras de semen puro, parece ser indicativo del éxito o fracaso del embarazo en FIV e ICSI. Aunque las muestras de semen puro no son utilizadas directamente en reproducción asistida sino que se procesan previamente mediante las técnicas de centrifugación en gradiente de densidad o *swim up*, parece que de alguna manera, la calidad del ADN de la muestra original influye en el resultado de la reproducción.

En el caso de las muestras de semen recuperado, el ensayo cometa 2D fue capaz de discriminar entre las muestras que consiguieron un embarazo y las que fracasaron. Las muestras con éxito de embarazo presentaron un DFI ss+ds de ADN significativamente inferior al de las muestras que no consiguieron el embarazo. Parece que la cantidad y no tanto la cualidad del daño de ADN condiciona el éxito del embarazo mediante FIV/ICSI. Muchos trabajos han obtenido resultados similares y otros, contradictorios. La gran variedad de diseños experimentales, la diversidad de las muestras y la disparidad de grupos de pacientes estudiados, hacen que sea difícil comparar los resultados obtenidos.

Por un lado, los resultados de varios de los trabajos publicados son consistentes con los obtenidos en este estudio. Los niveles altos de fragmentación de ADN se asocian con tasas de embarazo bajas (Henkel y col., 2004; Virro y col., 2004). De la misma manera, la integridad del ADN parece que presenta una íntima relación con el desarrollo embrionario postimplantación y las tasas de embarazo y aborto (Borini y col., 2006). Por el contrario, en estudios como el de Gandini y col. (2004) y Zini y col. (2005a) no se detectan diferencias en los valores de fragmentación de ADN entre los pacientes que consiguieron un embarazo y los que no, ni en ICSI ni en FIV convencional. Payne y col. (2005) tampoco pudieron establecer una correlación entre las tasas de embarazo y la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado determinada por SCSA. Huang y col. (2005), en un estudio realizado con muestras de pacientes en tratamiento FIV/ICSI, determinan la existencia de una correlación significativa entre la tasa de fragmentación y los parámetros seminales anormales y la tasa de fecundación, pero no encuentran correlación con la tasa de embarazo. En un trabajo reciente, Muriel y col. (2006), usando el test SCD, encontraron resultados similares y sugieren que la selección embrionaria realizada antes de la transferencia podría explicar parcialmente porqué la fragmentación del ADN correlaciona con la calidad embrionaria pero no está relacionada con el embarazo.

La extrema complejidad de todo el proceso, consecuencia de la interacción entre la diversidad en la naturaleza del daño, la capacidad variable de reparación de cada ovocito, junto con las particularidades técnicas de la tecnología de la reproducción asistida, podrían explicar las correlaciones dispares obtenidas en distintos estudios entre el daño de ADN detectado en el espermatozoide, la tasa de fecundación y la tasa de embarazo.

Algunos estudios, especialmente utilizando la técnica SCSA, han sugerido que habría un umbral de frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado (30%) por encima del cual la probabilidad de embarazo sería extremadamente baja (Evenson y col., 2002). En los resultados obtenidos en el presente estudio el DFI medio, calculado mediante SCD en las muestras de semen originales que consiguieron un embarazo mediante FIV-ICSI, está por debajo del 30% ($24,06 \pm 2,35\%$). Por el contrario, el DFI medio del grupo de muestras originales que no consiguieron un embarazo supera este umbral ($39,90 \pm 4,61\%$). De todas maneras y aunque el ajuste de los datos a los rangos establecidos por Evenson y col. no sea casual, la interpretación de estos márgenes debe hacerse con cautela. En determinados estudios (Payne y col., 2005; Velez de la Calle y col., 2008) parece ser que este umbral no es tan crítico, e individuos con valores superiores a los propuestos por Evenson y col. pueden dejar descendencia. Está claro que valores de fragmentación elevados podrían ser indicativos de la presencia de alguna anomalía, pero la interpretación rígida de este umbral puede llevar a error. Puesto que la fertilidad es una compleja combinación de varios elementos, sería pretencioso creer que individuos con índices de fragmentación de ADN superiores al 30% fueran incapaces de tener descendencia, y lo mismo a la inversa, que individuos con valores de fragmentación inferiores al 30% pudieran, con toda seguridad, conseguir un embarazo. Aunque los resultados de este estudio son alentadores, la fragmentación del ADN ha de considerarse como un parámetro más indicador de la calidad seminal. Sólo la interpretación conjunta de la integridad del ADN con otras variables de calidad seminal podría explicar la esterilidad asociada a cada uno de los pacientes.

6.5 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de cerdo. Efecto de la ADNasa sobre la fragmentación del ADN.

El protocolo ácido-lisis del test SCD empleado sobre espermatozoides humanos resulta muy útil para identificar, en una muestra de semen, espermatozoides con el ADN fragmentado

de acuerdo con el tamaño de halo. Sin embargo, esta discriminación de los espermatozoides no es fácil de establecer en las muestras de cerdo tratadas con este protocolo pues las diferencias en el tamaño de los halos de los espermatozoides con y sin señal de hibridación en el ensayo DBD-FISH no son tan evidentes.

El protocolo de lisis sin tratamiento ácido previo, parece ser un método mucho más eficaz para la discriminación de los espermatozoides de cerdo con el ADN fragmentado. El uso de este método en espermatozoides humanos da lugar a halos en los núcleos espermáticos con el ADN fragmentado que no se diferencian fácilmente de los núcleos con el ADN intacto. Parece que los núcleos espermáticos porcinos con el ADN intacto presentan una mayor resistencia al agente de lisis para liberar los bucles de ADN compactados que los núcleos de los espermatozoides humanos. El ensayo de ISNT realizado sobre espermatozoides previamente procesados con esta variante del test SCD confirmó que los núcleos de espermatozoides con halos grandes de difusión de fragmentos de ADN tenían su ADN fragmentado. Es posible que la desproteínización de los núcleos espermáticos desorganice la estructura toroidal de la cromatina de los espermatozoides de manera diferente en el caso de los núcleos con el ADN fragmentado e intacto. Probablemente, en los espermatozoides con el ADN intacto, los bucles de ADN presentes en cada uno de los toroides se liberen disponiéndose alrededor de una matriz residual. En el caso de los espermatozoides fragmentados, estos bucles se liberarían junto con los fragmentos de ADN presentes en ellos, de manera que los fragmentos se expandirían en torno al core dispersándose de forma más irregular.

El protocolo del test SCD modificado para ser utilizado sobre espermatozoides de cerdo permite la discriminación sencilla de espermatozoides con el ADN fragmentado en muestras de semen porcino. Esta prueba puede realizarse fácilmente en cualquier laboratorio básico de reproducción sin necesidad de instrumentos complicados o costosos. Los resultados obtenidos con esta variante del test SCD correlacionan con los obtenidos en el ensayo de ISNT. Los niveles de fragmentación de ADN encontrados en la muestra representativa de cerdos estudiada van de 0% a 6,63% con una media \pm error estándar de 2,10% \pm 0,26%; Estos resultados coinciden con los obtenidos por López-Fernández y col. en 2008 en un amplio estudio realizado en 180 muestras pertenecientes a cerdos españoles en el que la mayoría de las muestras estudiadas presentaban un DFI inferior al 5%.

Rybar y col. (2004) usando SCSA proponen que un 15% de fragmentación en muestras de espermatozoides de verraco podría ser considerado por encima de la normalidad. De manera que el DFI encontrado en las muestras de verraco estudiadas podía ser considerado aceptable para tales propósitos de acuerdo con el umbral establecido en la literatura.

Aunque la metodología del test SCD para el análisis rutinario es eficaz bajo la microscopía de campo claro, éste puede ser adaptado para estudios más específicos a la microscopía de fluorescencia. Así, este ensayo podría combinarse con otras técnicas para la visualización del daño de ADN como la ISNT, el DBD-FISH u otras estrategias de hibridación *in situ*. Esta posibilidad es interesante, pues permite una visualización más directa del daño de ADN, facilitando así la clasificación de las células en subcategorías con niveles y tipos diferentes de fragmentación de ADN. Además el uso del programa informático de análisis de imagen *Leica Qwin Pro* permite identificar de manera sencilla los distintos tipos de halo presentes en una muestra de espermatozoides de cerdo procesados con el test SCD. Este sistema podría utilizarse como base para el análisis automático del índice de fragmentación de muestras de semen de cerdo procesadas con el test SCD.

En resumen, la variante de la prueba de SCD desarrollada para espermatozoides de cerdo es un procedimiento simple y rápido para determinar la fragmentación del ADN presente en una muestra de semen. La discriminación de los espermatozoides con ADN fragmentado es sumamente fina y muy reproducible. Esto permitiría la valoración de rutina de los niveles fragmentación de ADN de muestras de espermatozoides de cerdo, así como la investigación básica y clínica sobre este tema, en cualquier laboratorio de análisis seminal. El test SCD es además, lo suficientemente versátil como para ser utilizado, sobre la base de la microscopía de fluorescencia combinado con otras técnicas moleculares en áreas de investigación más especializadas.

Además, los resultados de la segunda parte del presente estudio muestran que el proceso de fragmentación de ADN en espermatozoides de cerdo continúa incluso después de la eyaculación. Este aumento se ve acelerado por efecto de la temperatura. Se demuestra que la incubación *in vitro* de muestras de semen de cerdo seleccionadas diluidas en tampón fosfato, sin la adición de factores externos, resulta en un aumento progresivo del porcentaje de

espermatozoides con el ADN fragmentado. Este hecho es consistente con los resultados obtenidos en otros trabajos realizados en espermatozoides de cerdo y de otros mamíferos incubados *in vitro* durante un largo periodo de tiempo (Estop y col., 1993; Fraser y Strzezek, 2004; Boe-Hansen y col., 2005; Lopez-Fernández y col., 2007; Lopez-Fernández y col., 2008a). Se ha comprobado que el semen de cerdo presenta una mayor inestabilidad de ADN cuando se incuba durante 4 días en algunos diluyentes (Fraser y Strzezek, 2004). Recientemente, Boe-Hansen y col. (2005) han comprobado que la prolongación del tiempo de incubación de muestras de espermatozoides de cerdo diluidas reduce la integridad del ADN.

El progreso de la fragmentación del ADN *in vitro* observado en este trabajo está asociado con otros signos de deterioro espermático. El descenso de la calidad de los parámetros convencionales indicadores de la calidad seminal coincide con el aumento de los niveles de daño de ADN en las muestras. Esta observación ya había sido descrita anteriormente por Perez-Llano y col. (2006). La fragmentación del ADN comienza a aumentar cuando la integridad de las membranas espermáticas además de otros parámetros se altera. Esta alteración de la membrana plasmática del espermatozoide podría provocar la liberación de las enzimas proteolíticas activas presentes en el acrosoma, así como de las nucleasas endógenas (Rodriguez y col., 1997). Las modificaciones de las membranas plasmáticas harían a las células más permeables y por tanto, los núcleos estarían más accesibles a los ataques enzimáticos provocando así daño en el ADN.

Además, los resultados indican que la incubación *in vitro* de estas muestras en el diluyente comercial Acromax previene el daño de ADN. La fragmentación del ADN de los espermatozoides incubados en Acromax no varía después de 12 días de incubación *in vitro* ni a 15 ni a 37°C. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Perez-Llano y col. (2006) a 15°C. Parece que la fragmentación del ADN es una variable dinámica y modulable que depende de la estrategia de conservación. La elección adecuada del diluyente es importante para mantener la integridad del ADN sobre todo cuando el tiempo de conservación requerido es largo (Gadea, 2003). Si la fragmentación del ADN observada es el resultado de la actividad endonucleasa endógena, probablemente, la acción del agente quelante EDTA contenido en el diluyente Acromax, sea el responsable de la inhibición de la progresión de la fragmentación de ADN observada en las muestras incubadas en este diluyente comercial.

De hecho, los resultados de los experimentos realizados a continuación, muestran que el tratamiento de los espermatozoides de cerdo con ADNasa I acelera la fragmentación de ADN y que, por el contrario, el tratamiento de estos mismos espermatozoides con EDTA, previene la aparición del daño de ADN *in vitro*. Estas observaciones sugieren que una actividad endonucleasa participa en el proceso de la fragmentación y es bloqueada por la acción del EDTA. Además, estos resultados son coherentes con las observaciones realizadas por Ward M.A. y Ward W.S. en 2004 que afirman que los agentes quelantes como el EDTA neutralizan el efecto dañino de la incubación sobre la integridad del ADN. Estos agentes se emplean para proteger el ADN de la acción de nucleasas, pues capturan los iones metálicos Ca^{2+} y Mg^{2+} que éstas emplean como cofactores, inhibiendo así su actividad. Varios trabajos han encontrado que una simple solución de Tris-HCl con altas concentraciones de un agente quelante de calcio mantiene mejor la integridad cromosómica durante el proceso de liofilización que los medios de cultivo ordinarios (Kusakabe y col., 2001).

De manera que, para explicar la fragmentación de ADN espontánea observada durante la incubación de espermatozoides de cerdo *in vitro*, se puede postular la participación de una actividad endonucleasa en un proceso similar al apoptótico que ocurre en las células somáticas (Weil y col., 1998; Muratori y col., 2000; Sakkas y col., 2002). Varios artículos han comprobado la existencia de nucleasas en los espermatozoides de ratón, hamster y humano (Maione y col., 1997; Sotolongo y col., 2005). Esta actividad nucleasa podría ser parte de un mecanismo usado por el espermatozoide en respuesta a la exposición a un ambiente potencialmente peligroso (Spadafora, 1998; Ward y Ward, 2004). Este proceso estaría normalmente inhibido y se activaría específicamente con la exposición de la célula a determinados estímulos. La función de este mecanismo sería similar a la degradación cromosómica de la apoptosis en las células somáticas (Lawen, 2003). Su papel sería prevenir la fecundación y evitar la transmisión del ADN dañado al embrión. Las células espermáticas han de tener un proceso de muerte celular similar al de las células somáticas para evitar las consecuencias de la mutación en el desarrollo del embrión. Quizá el espermatozoide pueda reconocer ambientes potencialmente peligrosos y reaccionar frente a ellos mediante la activación de este mecanismo degradando su ADN.

6.6 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de toro. Relación de la morfología del espermatozoide con la fragmentación del ADN.

Los resultados de este estudio demuestran que existe relación entre la fragmentación del ADN y la morfología del espermatozoide. Se ha observado que la proporción media de anomalías morfológicas es superior en los espermatozoides con el ADN fragmentado que en los espermatozoides con el ADN intacto. Además, ciertos tipos de anomalías morfológicas parecen estar fuertemente asociados a la presencia de daño de ADN en los espermatozoides. En concreto, se muestra que la fragmentación de ADN está asociada a un tipo específico de anomalías morfológicas, las anomalías *major*. Cuando se analizaron por separado los niveles de anomalías *minor* y *major*, se observó que mientras las diferencias en el porcentaje de anomalías *minor* entre los espermatozoides con el ADN fragmentado y los espermatozoides con el ADN intacto no eran significativas, el porcentaje de anomalías *major* en las células fragmentadas era significativamente superior al de las no fragmentadas. Además, algunas anomalías morfológicas clasificadas como *major*, como formas dobles, cabezas con la base estrecha, cabezas pequeñas, colas cortas o gotas citoplasmáticas proximales sólo se encontraron asociadas a espermatozoides con el ADN fragmentado.

Las anomalías *major* y *minor* se han clasificado según los criterios definidos por Blom en 1973, que catalogó las anomalías morfológicas de acuerdo con los efectos adversos de éstas sobre la fertilidad. Las anomalías *major* son aquellas que se ha probado que están asociadas con una fertilidad reducida y, las *minor*, son aquellas que se considera que tienen poco impacto en la fertilidad masculina (Chenoweth, 2005). En este sentido, la asociación de la fragmentación del ADN a las anomalías *major*, parece que encaja con el hecho de que estas anomalías afecten de manera grave a la fertilidad. El daño de ADN presente en estas anomalías *major* podría ser el responsable de esa reducción de fertilidad. Además de este impacto en la fertilidad, se han descrito una serie de características más específicas de las anomalías *major*: (i) su presunto origen está asociado con un fallo o error en el funcionamiento de la espermatogénesis; (ii) ocurren en una proporción sustancial (al menos el 10%) de la población espermática; (iii) ocurren de manera constante en los sucesivos eyaculados; (iv) se han asociado con infertilidad o esterilidad masculina y, (v) pueden ser heredables.

Varios estudios han demostrado en espermatozoides humanos que existe una asociación entre la forma del espermatozoide y la integridad de la cromatina o las anomalías cromosómicas (Sailer y col., 1996; Franken y col., 1999; Fischer y col., 2003; Lewis-Jones y col., 2003). Los hombres infértiles con altos niveles de espermatozoides morfológicamente anormales tienen mayor riesgo de producir gametos aneuploides (Colombero y col., 1999; Calogero y col., 2001; Templado y col., 2002). Muriel y col. en un trabajo reciente (2007), determinaron la existencia de una asociación entre la presencia de aneuploidías cromosómicas y el daño de ADN en espermatozoides humanos.

Sin embargo, existen otros estudios cuyos datos sugieren que la asociación entre la morfología y el daño genético no es consistente (Rives y col., 1999; Viville y col., 2000; Khalili y col., 2006). Hay varias razones que podrían explicar los resultados dispares obtenidos. En primer lugar, no existe un único sistema de clasificación para la morfología (Barth y Oko, 1989; Saacke, 1990). La clasificación de las anomalías morfológicas es un cajón de sastre y dentro de ese parámetro se juzgan un gran número de estructuras. En segundo lugar, la morfología y el daño del ADN del espermatozoide habitualmente se determinan en la misma muestra pero no en el mismo espermatozoide. Los test para la evaluación del daño de ADN no permiten valorar al mismo tiempo la morfología del espermatozoide. El test SCD utilizado en este estudio, sin embargo, permite analizar a nivel celular y de manera simultánea ambos parámetros, morfología y daño de ADN. En tercer lugar, quizá el daño de ADN está relacionado exclusivamente con tipos específicos de anomalías morfológicas. De hecho, esto es lo que se encuentra en este estudio, que las anomalías morfológicas *major* están presentes, principal y, en algunos casos, hasta exclusivamente, en los espermatozoides con el ADN fragmentado. Mientras que las anomalías morfológicas *minor* están presentes indistintamente en espermatozoides con el ADN fragmentado e intacto.

Pero, ¿cómo se originan estos espermatozoides con defectos morfológicos y ADN nuclear fragmentado? La presencia de espermatozoides morfológicamente anormales y con daño de ADN en el eyaculado de los toros se podría explicar como resultado de un proceso apoptótico abortivo. La aparición de estos defectos morfológicos provocaría la fragmentación del ADN de estas células como parte del mecanismo apoptótico desarrollado para eliminar células defectuosas. En el proceso normal de la gametogénesis, las células germinales se expanden

clonalmente en varias rondas de mitosis antes de comenzar el proceso de diferenciación. Esta expansión clonal es excesiva y está equilibrada por una apoptosis selectiva en la que los gametos defectuosos son eliminados (Sinha Hikim y Swerdloff, 1999; Sakkas y col., 2002). Los espermatozoides morfológicamente anormales y con el ADN nuclear fragmentado presentes en el eyaculado podrían ser el resultado de un fallo en la apoptosis, un error que impidiera que se completara el proceso. Los espermatozoides con defectos morfológicos habrían sido marcados para su entrada en apoptosis pero, han escapado, completando sólo parcialmente el proceso de muerte celular. De esta manera, aparecerían en el eyaculado espermatozoides con anomalías morfológicas y con el ADN nuclear fragmentado.

Por otro lado, estas anomalías morfológicas podrían tener un origen genético. Se puede considerar el daño de ADN como la base fisiológica de algunos defectos morfológicos. Un espermatozoide es básicamente un paquete de información genética, algunos errores en esta información debidos a la presencia de roturas en el ADN podrían provocar la fabricación de una célula con morfología anormal. Por supuesto que otros factores no genéticos pueden influir en la fabricación de un espermatozoide morfológicamente anormal, de hecho, los factores ambientales se consideran los más frecuentes (Chenoweth, 2005), pero de acuerdo con nuestros resultados, parece que en el caso de las anomalías *major*, el daño genético podría ser el responsable principal de los defectos morfológicos presentes en la célula. Algunos estudios afirman que ciertas anomalías morfológicas están controladas genéticamente (Salisbury y Baker, 1966; Chandler y Adkinson, 1990; Chenoweth, 2005). Varios estudios han descrito como heredables, en humanos y en otras especies animales, muchos de los defectos morfológicos del espermatozoide. Anderson y Makinen (2000) comprobaron la base genética del defecto de cola corta demostrando su transmisión a la descendencia mediante ICSI. Baccetti y colaboradores afirman que algunos defectos morfológicos peculiares y raros deben tener un origen genético puesto que son más frecuentes en pacientes consanguíneos que en los no consanguíneos y su presencia está relacionada con distintos niveles de consanguineidad (Baccetti y col., 2001). Las anomalías morfológicas más frecuentes que se sabe que tienen un origen genético citadas en la literatura son: defecto cráter (*crater defect*) (Heath y Ott, 1982; Larsen y Chenoweth, 1990), miniacrosoma (Baccetti y col., 1991), cola corta (*tail stump*) (Blom, 1976; Vierula y col., 1987), separación de la cabeza y la cola del espermatozoide (Baccetti y col., 1989; Chemes y col., 1999).

La detección de anomalías morfológicas con posible impacto en la fertilidad es interesante a la hora de evaluar la calidad de una muestra. Puesto que las anomalías morfológicas *major* se han asociado con fertilidad reducida, su identificación podría ser muy valiosa a la hora de evaluar la fertilidad potencial de una muestra. La relación presentada en este estudio entre las anomalías *major* y la fragmentación del ADN sugiere que el uso del test SCD para la evaluación simultánea de la morfología y el daño de ADN podría ser de utilidad para la detección de estos defectos. Además, puesto que no sólo los espermatozoides con anomalías morfológicas presentan daño de ADN, sino que también existen espermatozoides morfológicamente normales con daño de ADN, la incorporación en el análisis seminal de rutina de una prueba para la evaluación de la integridad del ADN podría proporcionar información adicional sobre la calidad y, por tanto sobre la fertilidad potencial de una muestra de semen.

6.7 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de ratón. Relación de la maduración del espermatozoide con la fragmentación del ADN.

Los resultados muestran que el nivel de protaminación de las tres regiones del epidídimo de ratón estudiadas (*caput*, *corpus* y *cauda*) no varía. Ni la tinción con azul de anilina ni con cromomicina A3 detectaron cambios en la estructura de la cromatina en el tránsito por el epidídimo. Se comprueba que el intercambio de histonas por protaminas se produce en el testículo en etapas anteriores a la llegada de los espermatozoides al epidídimo (Bellve y col., 1975; Goldberg y col., 1977). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros estudios que afirman que no se producen cambios en la cantidad de protaminas durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Saowaros y Panyim, 1979; Sakkas y col., 1995).

Por el contrario, al estudiar la integridad del ADN en el tránsito por el epidídimo, el test SCD y el ensayo de ISNT detectaron niveles de fragmentación de ADN decrecientes en las tres regiones del epidídimo estudiadas a medida que los espermatozoides descendían por dicho túbulo. García Macías y col. 2006, en un trabajo reciente, obtuvieron resultados similares. En su estudio observan diferencias en el nivel de fragmentación de ADN, evaluado mediante SCSA, de los espermatozoides recogidos de distintas partes del epidídimo en tres especies de animales distintas: oveja, ciervo y perro. A partir de sus observaciones sugieren que durante el tránsito por

el epidídimo tiene lugar un proceso de maduración que implica la reducción de las roturas de ADN presentes en los espermatozoides para facilitar el recambio proteico. Proponen que estas roturas han de ser reparadas a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo. Además, otros estudios realizados usando distintos métodos bioquímicos también afirman que la integridad de la cromatina de los espermatozoides aumenta a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo (Kosower y col., 1992; Said y col., 1999). Los cambios descritos por estos autores se han explicado generalmente como el resultado de la oxidación de los tioles de la protaminas a disulfuros. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos en este estudio, la estabilización creciente de los núcleos espermáticos en el paso a través del epidídimo podría ser el resultado de ambos procesos, la formación de puentes disulfuro y la reparación de roturas de ADN.

No obstante, los autores de varios trabajos aseguran que las roturas de ADN producidas para facilitar el intercambio de histonas por protaminas en los espermatozoides se reparan antes de llegar al epidídimo (Sakkas y col., 1995; Marcon y Boissonneault, 2004). El ensayo TUNEL realizado por Marcon y Boissonneault en 2004 en secciones de epidídimo de ratón, no detecta la presencia de roturas de ADN en los espermatozoides del epidídimo, incluso tras la descondensación inducida de los núcleos espermáticos. Esto podría ser explicado como consecuencia de la deposición de las protaminas y del nivel de condensación extremo del núcleo del espermatozoide. El acceso de la terminal transferasa podría verse dificultado e incluso impedido, por la compactación de la cromatina nuclear espermática en estas etapas. Quizá la descondensación nuclear previa realizada no sea suficiente para permitir a la terminal transferasa acceder al ADN. Lo mismo podría explicar los resultados obtenidos por Sakkas y col. (1995) usando la ISNT en espermatozoides de ratón, pues varios estudios han demostrado que *in vitro*, la protaminación de los espermatozoides bloquea el acceso de la ADN polimerasa a las roturas en el ADN (Bianchi y col., 1993; McPherson y Longo, 1993b). Quizá el test SCD presente una mayor sensibilidad que otras técnicas para detectar células con el ADN fragmentado en este tejido.

La presencia de roturas en los espermatozoides del epidídimo podría explicar porqué los espermatozoides de las regiones del epidídimo *caput* y *corpus* son incapaces de fecundar un ovocito mientras que los espermatozoides de la región distal del *corpus* y de la región *cauda* sí

que tienen esta capacidad (Haidl, 1994; Weissenberg y col., 1994). Quizá esta incapacidad está relacionada no sólo con el escaso número de puentes disulfuro formados en estas etapas sino también con el elevado nivel de daño de ADN presente en los espermatozoides de estas regiones.

Un trabajo bastante revelador realizado por Talebi y col. en 2007 en espermatozoides de ratas de experimentación con lesión en la médula espinal (SCI) mostró que los espermatozoides de las ratas con SCI tenían mayores niveles de daño de ADN que los controles, mientras que las tasas de espermatozoides AB+ y CMA3+ fueron las mismas que las de los controles, espermatozoides maduros y con morfología intacta. Puesto que está descrito que en la SCI la actividad epididimaria normal se altera (Hirsch et al. 1999) podemos inferir de estos experimentos que hay una actividad reparadora del ADN en la fase de la maduración epididimaria que está siendo interrumpida o alterada en las ratas con SCI. De manera que los cambios en la estabilidad de la cromatina detectados por distintas técnicas que se han observado en espermatozoides de distintas especies de mamíferos durante su tránsito por el epidídimo podrían ser resultado de ambos procesos, la compactación creciente de la cromatina producida por la formación de puentes disulfuro y la reparación de las roturas del ADN de los espermatozoides.

En conclusión, en este estudio se confirma que el proceso de protaminación de los núcleos espermáticos se realiza en el testículo y termina definitivamente antes de que los espermatozoides lleguen al epidídimo. Sin embargo, las roturas de ADN implicadas en este recambio de histonas por protaminas están presentes todavía en los espermatozoides del epidídimo, y su nivel va disminuyendo a medida que los espermatozoides descienden por este tubo sugiriendo que la reparación de estos cortes en el ADN se completa en el epidídimo.

Los resultados de este estudio pueden tener implicaciones importantes en el manejo de las muestras de los bancos de recursos genéticos basados espermatozoides de la región *cauda* del epidídimo. La mayoría de las muestras de estos bancos que pertenecen a especies salvajes consisten fundamentalmente en espermatozoides recuperados del epidídimo, por tanto, es importante evaluar que estas muestras presentan una integridad de la cromatina adecuada para poder ser utilizadas como fuente de germoplasma.

6.8 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de caballo. Relación de la fertilidad con la fragmentación del ADN.

El desarrollo de un test sencillo para valorar el daño de ADN en espermatozoides de caballo es interesante dada la creciente utilización de las tecnologías de la reproducción artificial en esta especie. Especialmente porque, en el caballo, debido a la incapacidad de producir embriones *in vitro* mediante la FIV convencional, la técnica más utilizada es la ICSI (Squires, 2005). Desde este punto de vista, resulta esencial incluir en el análisis seminal un test para valorar la calidad del material genético que se introduce en el ovocito. La metodología que aquí se contrasta es simple, barata y útil para el laboratorio de análisis de rutina. Sabemos que la fertilidad potencial de un caballo es difícil de predecir de forma segura en base a un único ensayo. Puesto que cada espermatozoide consiste en múltiples compartimentos subcelulares con distintas funciones, es obvio que hay muchos parámetros que contribuyen al éxito de un espermatozoide alcanzando y fecundando el óvulo. El hecho de que la fragmentación de ADN correlacione, como muestran los resultados de este estudio, con otros parámetros indicadores de la calidad seminal, hace que ésta pueda ser un buen complemento en el análisis de las características de una muestra.

El DFI medio de la población de caballos estudiada en la primera parte de este estudio es $10,35 \pm 1,95$, similar al obtenido por Lopez-Fernández y col. (2007) pero superior al documentado para otras especies de animales domésticos como el cerdo, la oveja o el toro (Rybar y col., 2004; Lopez-Fernández y col., 2008a; Lopez-Fernández y col., 2008b). Es probable que las diferencias observadas entre estas especies en el DFI estén relacionadas con el grado de selección artificial que se ha realizado en cada una (Lopez-Fernández y col., 2007). Por ejemplo, los cerdos están muy seleccionados en términos de fecundidad y edad. En las granjas, la vida reproductiva de un cerdo es de 4 años. En el caso de los caballos de cría, la fertilidad es menor principalmente porque la selección se basa en características del pedigree o de rendimiento atlético más que reproductivo (Colenbrander y col., 2003; Neild y col., 2005).

En términos de fertilidad, los resultados indican que la fragmentación del ADN, determinada mediante el test SCD, podría ser de utilidad. El índice de fragmentación de ADN correlaciona de manera negativa con la tasa de embarazo y de manera positiva con el número

de servicios por embarazo. Estos resultados son coherentes con los obtenidos recientemente por Morrell y col. (2008) que comprueban que la integridad de la cromatina, medida mediante SCSA, permite predecir la capacidad fecundante de los eyaculados de caballo. Encuentran que existe una correlación negativa entre el DFI y la tasa de embarazo. Estudios anteriores también habían determinado una asociación similar entre la calidad de la cromatina y la fertilidad en el caballo (Love y Kenney, 1998; Love, 2005) tanto en grupos de caballos de fertilidad diversa como en grupos de caballos clínicamente fértiles (Kenney y col., 1995). En el estudio realizado por Kenney y col. (1995) un grupo de caballos con un rango amplio de fertilidad, que iba desde caballos prácticamente estériles hasta caballos muy fértiles, se determinó que existía una relación entre la susceptibilidad *in vitro* del ADN a la desnaturalización y la fertilidad. En un estudio posterior realizado por Love y Kenney (1998), se explora la misma relación pero, esta vez, en un grupo de caballos clínicamente fértiles obteniéndose el mismo resultado. La variación intrínseca en la integridad de la cromatina del espermatozoide detectada entre caballos fértiles de una población activa dedicada a la reproducción, indica que el análisis de la integridad de la cromatina proporciona información adicional distinta a la de los test de calidad habituales.

Además, cuando las muestras seminales analizadas se clasificaron en dos grupos con fertilidad alta y baja de acuerdo con los criterios propuestos por Dowset y Pattie en 1982, los resultados indicaron que los caballos pertenecientes al grupo de fertilidad baja poseían un DFI significativamente superior al del grupo de caballos con fertilidad alta. De manera que los niveles de DFI elevados están asociados a una fertilidad reducida. Los índices de fragmentación medios observados en el grupo de caballos con fertilidad alta ($7,47\% \pm 4,41$) y baja ($32\% \pm 10,58$) están dentro de los márgenes propuestos en la literatura. Love, en un trabajo reciente, sugirió que las muestras de semen con DFIs por encima del 27% estaban asociadas con problemas de fertilidad (Love, 2005).

En conclusión, de acuerdo con los resultados de este estudio, el test SCD podría utilizarse como prueba para la valoración de las muestras y la predicción de la capacidad fecundante de los eyaculados de caballos. La valoración de la fragmentación del ADN en el caballo combinado con el análisis de los parámetros tradicionales podría ser un indicador fiable del potencial reproductivo de una muestra y quizá permitiría identificar más fácilmente los caballos subfértiles.

6.9 El Test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides de oveja. Efecto de la vacunación sobre la fragmentación del ADN

Los resultados de este estudio indican que la vacunación puede aumentar el índice de fragmentación de ADN espermático y que este aumento en los niveles de fragmentación del ADN es un proceso reversible biológicamente.

Se sabe que las células de la línea germinal resultan afectadas de manera significativa por los agentes infecciosos así como por los episodios de vacunación contra los mismos agentes (Givens, 2006). En un estudio realizado en cerdos (Christopher-Hennings y col., 1997) se observó que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y morfología normal se reducía de manera significativa en los animales vacunados. En la línea germinal masculina no sólo la espermiogénesis puede verse afectada, también la meiosis sufre los efectos colaterales de la vacunación, como se ha sugerido por la elevada presencia de univalentes que implican tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales en un grupo de ratones vacunados contra la rabia en comparación con los controles (Das y Nayak, 1988). En el caso analizado en este estudio, la duración del periodo de recuperación de la tasa de fragmentación de ADN normal parece indicar que la espermiogénesis más que la espermatogénesis ha de estar afectada. La duración de la espermiogénesis varía en las distintas especies pero es bastante constante dentro de cada especie. En la oveja la espermiogénesis dura unos 18 días mientras que en el toro o el caballo ésta dura 21 días (Courot y col., 1970; Russel y col., 1990). La espermatogénesis dura de 64 a 75 días en la especie humana (Heller y Clermont, 1963) y 60 días en la mayoría de los animales domésticos (Cunningham, 2005). En el caso analizado en este trabajo, el tiempo en el que el espermatozoide alcanza los máximos niveles de fragmentación de ADN junto con el rápido periodo de recuperación espermática parecen indicar que la vacunación afecta más bien a la espermiogénesis. Si las células meióticas estuvieran afectadas, el tiempo de recuperación sería mayor que el observado. En un estudio realizado en búfalo, se describen los efectos adversos producidos por la vacunación contra la fiebre aftosa en los parámetros seminales hasta un mes después de la vacunación (Singh y col., 2003b), un periodo de recuperación de la calidad seminal similar al observado en este estudio.

El efecto de la vacunación en los parámetros seminales no se conoce bien. Probablemente el tipo de vacuna y el fondo genético del animal sean determinantes de la reacción inmune de un individuo. La inoculación de *Brucella ovis* en el epidídimo de ovejas provocó lesiones graves en el tejido además de un elevado número de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, indicadores de una respuesta inflamatoria inducida. Desafortunadamente los efectos de esta inoculación provocados en los espermatozoides no se describen en el experimento (Rahaley y Dennis, 1984). Es fácil suponer que el ADN de los espermatozoides en estas circunstancias pudiera verse afectado pues se sabe que la leucocitospermia produce estrés oxidativo, que con frecuencia induce daño en el ADN (Kovalski y col., 1992; Aitken y Fisher, 1994; Aitken y Krausz, 2001; Lemkecher y col., 2005).

Además, la vacunación puede provocar una respuesta de aumento de la temperatura, o bien local, a través del proceso inflamatorio, o bien general, induciendo fiebre en algunos casos. La concentración, la motilidad y la morfología pueden verse afectadas por la fiebre, especialmente durante la espermiogénesis (Carlsen y col., 2003). También parece que el aumento de la temperatura afecta a la estructura de la cromatina causando una gran cantidad de roturas de ADN, alterando la síntesis proteica (Hendin y col., 1999; Evenson y col., 2000; Enciso y col., 2006) y disminuyendo el número de puentes disulfuro en las protaminas (Love y Kenney, 1999).

Los efectos de la vacunación en la calidad espermática y en particular en la integridad de ADN consisten probablemente en un compendio de factores y efectores. Probablemente el fondo genético, la capacidad de respuesta al estrés oxidativo y las variaciones de temperatura determinen finalmente la respuesta de cada individuo. Las interacciones de todos estos factores podrían ser la explicación de los grandes niveles de variación en los valores de fragmentación de ADN observados en los animales tras la vacunación.

En resumen, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con Miloxan aumenta el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado hasta 10 veces de media. Sin embargo, este efecto negativo de la vacunación sobre la integridad del ADN parece reversible biológicamente, valores próximos a los niveles de fragmentación normales se restauran 40 días después de la vacunación. En base a estos datos, debe evitarse el uso de

muestras de semen de animales vacunados hasta al menos un mes después de la vacunación. La evaluación de la integridad de la cromatina en los organismos usados con interés reproductivo es interesante especialmente cuando los animales han sufrido un episodio de estrés. Principalmente en los animales que se usan de manera reiterada para recoger muestras de semen para reproducción asistida, este parámetro debería ser controlado periódicamente durante toda su vida reproductiva.

6.10 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre los espermatozoides de distintas especies animales

Los resultados de este estudio confirman que los núcleos de los espermatozoides de marsupiales estudiados son más sensibles al ataque oxidativo que los de las especies del grupo Eutheria analizadas. Varios autores han comprobado que, en las especies de marsupiales investigadas hasta la fecha, la cromatina espermática es frágil, sus núcleos espermáticos se descondensan fácilmente en diversas condiciones como: secado, dilución de o tratamiento suave con detergentes, mientras que estos tratamientos no tienen efectos en los núcleos espermáticos del grupo Eutheria (Bedford y Calvin, 1974b; Cummins, 1980; Balhorn, 1989; Winkfein y col., 1993; Mate y col., 1994; Retief y col., 1995a). Se cree que esta vulnerabilidad de los núcleos de los espermatozoides de la mayoría de las especies de marsupiales se debe a que sus protaminas carecen de cisteínas y por tanto a la ausencia de puentes disulfuro inter a intra protaminas.

En los mamíferos de la infraclase Eutheria, las protaminas son moléculas ricas en residuos de cisteína que se oxidan durante el tránsito por el epidídimo para formar una red tridimensional de puentes disulfuro entre las moléculas de protaminas en el núcleo del espermatozoide (Calvin y Bedford, 1971). Esta extrema compactación se cree que ayuda a proteger al ADN nuclear del daño (Rousseaux y Rousseaux-Prevost, 1995). Parece que el establecimiento de puentes disulfuro juega un papel importante en la estabilización y protección de la cromatina espermática frente al daño (Bennetts y Aitken, 2005). La falta de estos puentes disulfuro hace que los núcleos inmaduros sean más vulnerables a la perturbación física y química (Kaneko y col., 2003). Algunos estudios sugieren que la protaminación incompleta puede hacer a las células espermáticas más sensibles al daño de ADN (Bianchi y col., 1993; Cho

y col., 2003), de manera que, la formación de puentes disulfuro representa un importante mecanismo de protección del espermatozoide frente al daño de ADN que confiere estabilidad a la cromatina del espermatozoide. La verificación de esta relación es difícil de comprobar experimentalmente de manera distinta a la presentada en este estudio, puesto que cualquier intento de revertir el proceso de *crosslinking* mediante la adición de agentes reductores, crearía, artificialmente, daño de ADN (Struchkov y col., 1992; Szczygiel y Ward, 2002).

Estas diferencias en la compactación entre los núcleos espermáticos de los grupos Eutheria y Metatheria podrían explicarse en términos evolutivos de adaptación. Se cree que debe existir una fuerte implicación de causa-efecto entre el carácter de la zona pelúcida y el diseño de la cabeza del espermatozoide en ambos grupos de mamíferos.

En las especies del grupo Eutheria el desarrollo de esta cromatina tan resistente se ha propuesto como una adaptación para prevenir el daño del núcleo del espermatozoide no sólo durante la migración por los tractos reproductivos masculino y femenino sino también durante la penetración de la zona pelúcida (Bedford, 1991; Yanagimachi, 1994b). La rigidez del espermatozoide de este grupo de mamíferos, basada en la red de puentes disulfuro, es básica para penetrar la gruesa zona pelúcida. Además, puesto que esta zona es mucho más resistente a la proteólisis que la de los marsupiales, se cree que el espermatozoide de los mamíferos del grupo Eutheria ha desarrollado una estrategia para la penetración de la zona pelúcida basada en el *empuje cortante* (*cutting thrust*) para la que es fundamental la rigidez nuclear de éste (Inoue y Wolf, 1974; Greve y Wassarman, 1985; Drobnis y col., 1988; Green, 1988; Bedford, 1991). En los marsupiales, sin embargo, los elementos de la estructura del espermatozoide parecen optimizar la aplicación del contenido del acrosoma en una zona más delgada y sensible a las proteasas.

Además de las diferencias observadas en este estudio entre los núcleos de los espermatozoides pertenecientes a los distintos grupos de mamíferos, también se han constatado diferencias en la resistencia de los núcleos espermáticos de las distintas especies dentro del grupo Eutheria. Esta estabilidad nuclear heterogénea podría estar relacionada con la cantidad de residuos de cisteína, susceptibles de formar puentes disulfuro, presentes en las protaminas. Perreault y col. (1988) afirmaron que las diferencias en la estabilidad nuclear de los

espermatozoides de las distintas especies parecen estar relacionadas con el número y/o la eficiencia de los puentes disulfuro en los núcleos espermáticos, rasgo que debe estar determinado por el tipo(s) de protamina(s) presentes. En las especies analizadas, el número de cisteínas presentes en la protamina 1 de los espermatozoides resultó ser inversamente proporcional al efecto nocivo del H_2O_2 . En las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, el genoma nuclear de los espermatozoides humanos resultó ser más susceptible al daño de ADN oxidativo que el del ratón o el cerdo. El ensayo cometa 2D reveló un leve aumento en el índice de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos expuestos a H_2O_2 al 0,003% durante 30 minutos y una llamativa producción de daño de ADN en los espermatozoides de esta misma especie en la exposición a H_2O_2 al 0,03% comparada con la moderada producción de daño de ADN producido en los espermatozoides de ratón y la ausencia de efecto en los espermatozoides de cerdo. Es llamativo el hecho de que la estructura de la cromatina del cerdo no se vio alterada tras la exposición a ninguna de las dos primeras dosis de H_2O_2 (0,003% y 0,03%).

Como se ha dicho antes, esto podría estar relacionado con el número de cisteínas presentes en las protaminas, en concreto, en la protamina 1. Puesto que la presencia de cisteínas en las protaminas se ha asociado a la formación de puentes disulfuro (Marushige y Marushige, 1975; Evenson y col., 1989), es fácil pensar que un mayor número de cisteínas permitiría el establecimiento de un mayor número de puentes disulfuro y, por tanto, conferiría al núcleo una mayor estabilidad y resistencia.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

De carácter general:

- El test SCD es un método simple, rápido, seguro y muy reproducible para evaluar la fragmentación del ADN de los espermatozoides de una gran variedad de especies de mamíferos.
- El ensayo cometa 2D se muestra como una técnica fiable para la determinación de la cantidad y el tipo de roturas de ADN presentes en el mismo espermatozoide. Esta prueba permite evaluar, de manera simultánea a nivel celular, roturas de ADN de cadena sencilla y doble.

De carácter concreto:

En humanos

- El test SCD desarrollado para espermatozoides humanos permite la determinación de distintos niveles de daño de ADN a nivel celular. Los sistemas de análisis de imagen *Volocity* y *Leica Qwin Pro* son herramientas eficaces para la discriminación de espermatozoides procesados con el test SCD según el nivel de daño de ADN.
- Los métodos de selección de espermatozoides centrifugación en gradiente de densidad y *swim up* presentan una capacidad de recuperación de espermatozoides móviles similar y son igualmente eficaces a la hora de eliminar espermatozoides fragmentados y degradados. Esta tendencia se observa independientemente de que el análisis se realice con el test SCD o con el ensayo cometa 2D. Sin embargo, el protocolo de centrifugación en gradiente de densidad, utilizado en este trabajo, produce recuperados de espermatozoides con un porcentaje de roturas de cadena sencilla inferior al *swim up*.
- La concentración de espermatozoides de las muestras de semen procesadas mediante centrifugación en gradiente de densidad o *swim up* podría utilizarse como indicador del éxito o fracaso de embarazo en inseminación artificial intrauterina.

- La fragmentación del ADN, medida mediante el test SCD o el ensayo cometa 2D, es un buen parámetro indicador de la calidad seminal, pero no parece tener un valor predictivo del embarazo en inseminación artificial intrauterina.
- El índice de fragmentación de ADN, medido mediante el test SCD y/o el ensayo cometa 2D, podría utilizarse para predecir el resultado del embarazo en las técnicas de reproducción artificial FIV e ICSI.
- Los pacientes con varicocele presentan una tasa de espermatozoides degradados superior a la de los hombres fértiles e infértiles de distinta etiología. La exposición intensa y prolongada a condiciones de alta temperatura y estrés oxidativo o a una combinación de ambos parece ser la causa del daño de ADN nuclear de los espermatozoides degradados.

En otros mamíferos

- El test SCD modificado para ser utilizado en espermatozoides de cerdo, toro, ratón caballo y oveja es un método sencillo, fiable y muy reproducible para la evaluación de la fragmentación del ADN y se basa en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos espermáticos cuando se someten a una lisis de membranas y protaminas.
- En el caso del ganado porcino, el proceso de fragmentación del ADN continúa *in vitro* después de la eyaculación y este proceso se ve acelerado por efecto de la temperatura y del estrés oxidativo. El progreso de la fragmentación del ADN parece ser el resultado de una actividad endonucleasa endógena y está asociado con el deterioro de otros parámetros indicadores de la calidad seminal.
- En el caso del ganado bovino, la fragmentación de los espermatozoides se asocia con la presencia de anomalías morfológicas, en concreto con un tipo de anomalías morfológicas, las anomalías *major*.

- En el caso del ganado equino, el índice de fragmentación de ADN podría ser utilizado junto con los criterios de Dowset y Pattie (1982) para discriminar entre caballos con distintos niveles de fertilidad.
- En el caso del ganado ovino, la vacunación aumenta temporalmente el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides ovinos. Este aumento en los niveles de fragmentación del ADN es un proceso reversible biológicamente.
- En el caso del ratón, la presencia de roturas de ADN en los espermatozoides del epidídimo de ratón disminuye a medida que éstos atraviesan el túbulo desde la región *caput* a la región *cauda*.
- La presencia de puentes disulfuro en los núcleos espermáticos de las especies de mamíferos del grupo Eutheria *Sus domesticus*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* confiere estabilidad a la cromatina del espermatozoide y los hace más resistentes al ataque oxidativo que los de las especies de marsupiales analizadas *Phascolarctos cinereus*, *Macropus giganteus* y *Vombatus ursinus*.

FIGURAS

Figura 1. Comparación del tamaño del espermatozoide con el óvulo. La diferenciación de las células germinales masculinas y femeninas resulta en la producción de células muy especializadas con rasgos únicos que no están presentes en otro tipo celular. El propósito de la eliminación selectiva de ciertos orgánulos y de la adaptación de otros es formar dos células complementarias que al unirse en la fecundación dan lugar a un cigoto capaz de formar un nuevo individuo. Ilustración original de Wolf (1928), extraída del libro *The Sperm Cell* (De Jonge y Barratt, 2006).

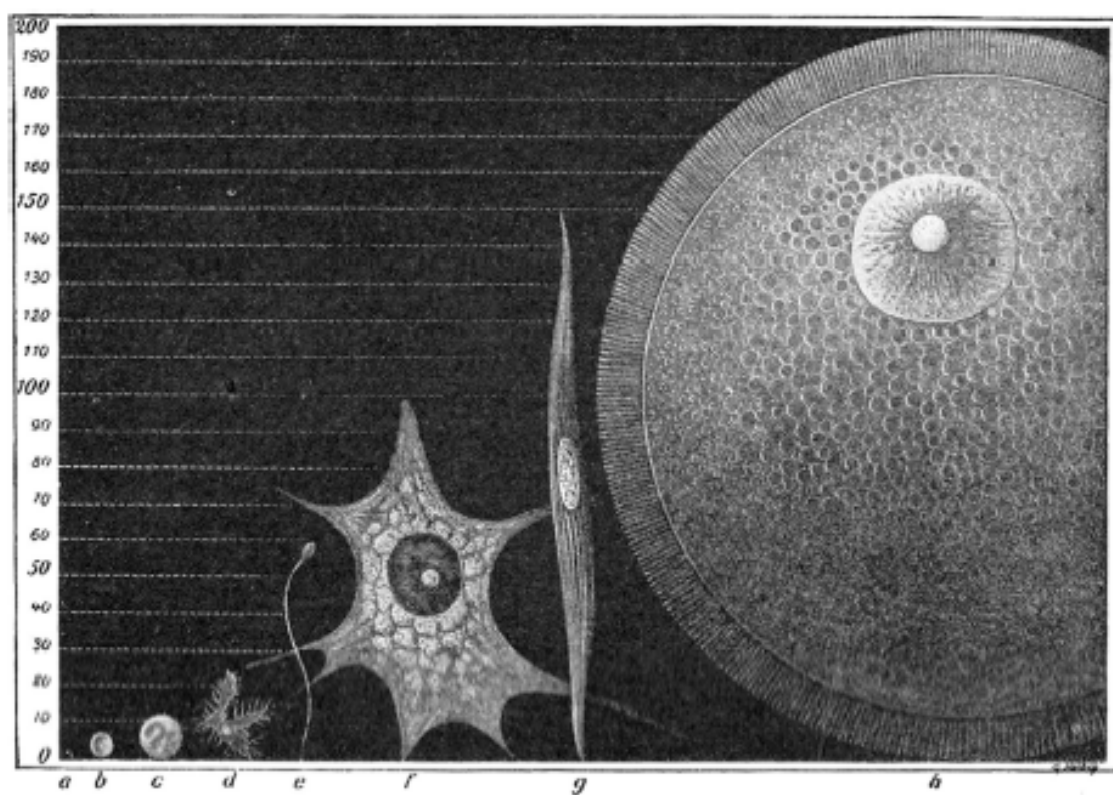


Figura 2. La estructura del espermatozoide. El espermatozoide de los mamíferos está compuesto por una cabeza, que contiene el núcleo y el acrosoma, y una cola o flagelo, recubiertos por una membrana plasmática. A. Corte transversal de la pieza media del flagelo del espermatozoide en el que se observa su estructura interna. B. Corte transversal de la pieza principal del flagelo del espermatozoide en el que se observa su estructura interna. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

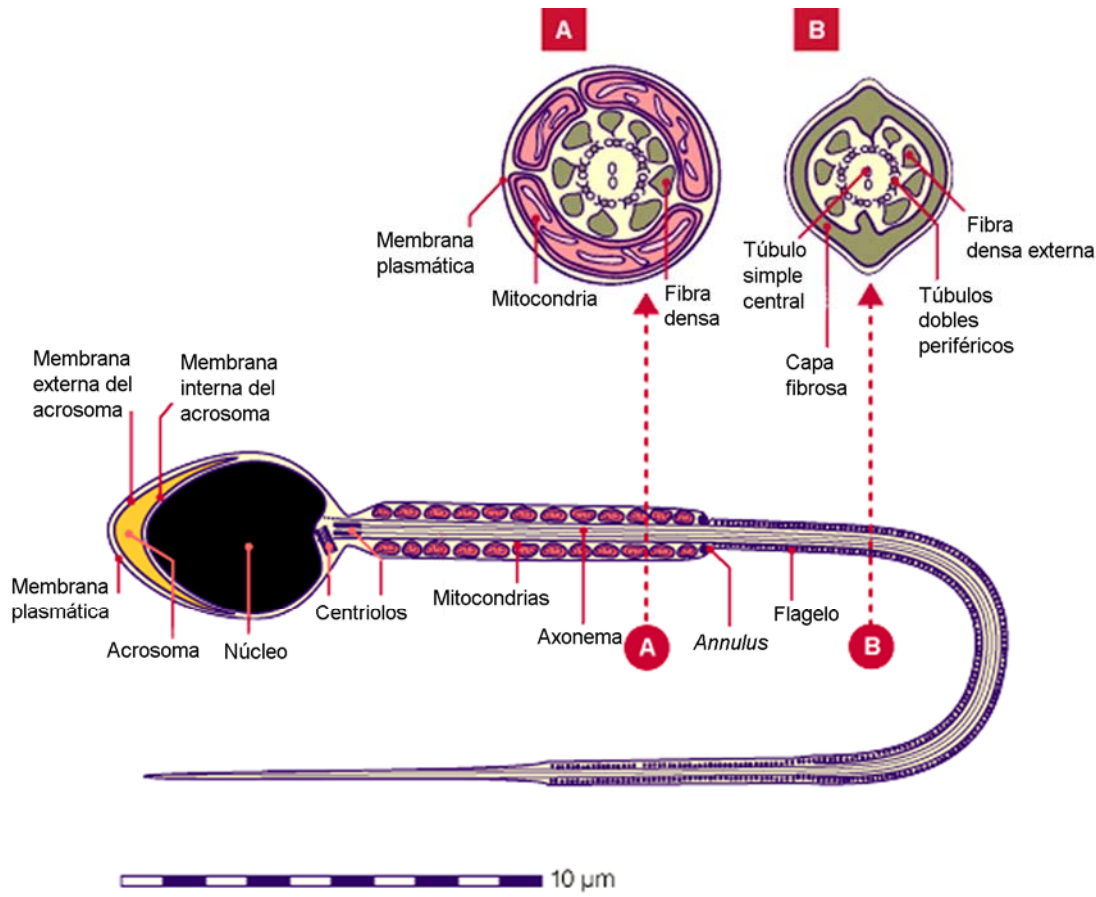


Figura 3. El espermatozoide en la reacción acrosómica. (a) La membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana externa del acrosoma, liberándose el contenido de éste al medio externo. (b) La membrana externa del acrosoma desaparece dejando al espermatozoide protegido por la membrana interna del acrosoma. (c) A continuación tiene lugar la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, la región del espermatozoide implicada en este proceso es el segmento ecuatorial. Además, la región postacrosomal juega un papel importante en la activación del ovocito y el inicio del desarrollo del cigoto. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

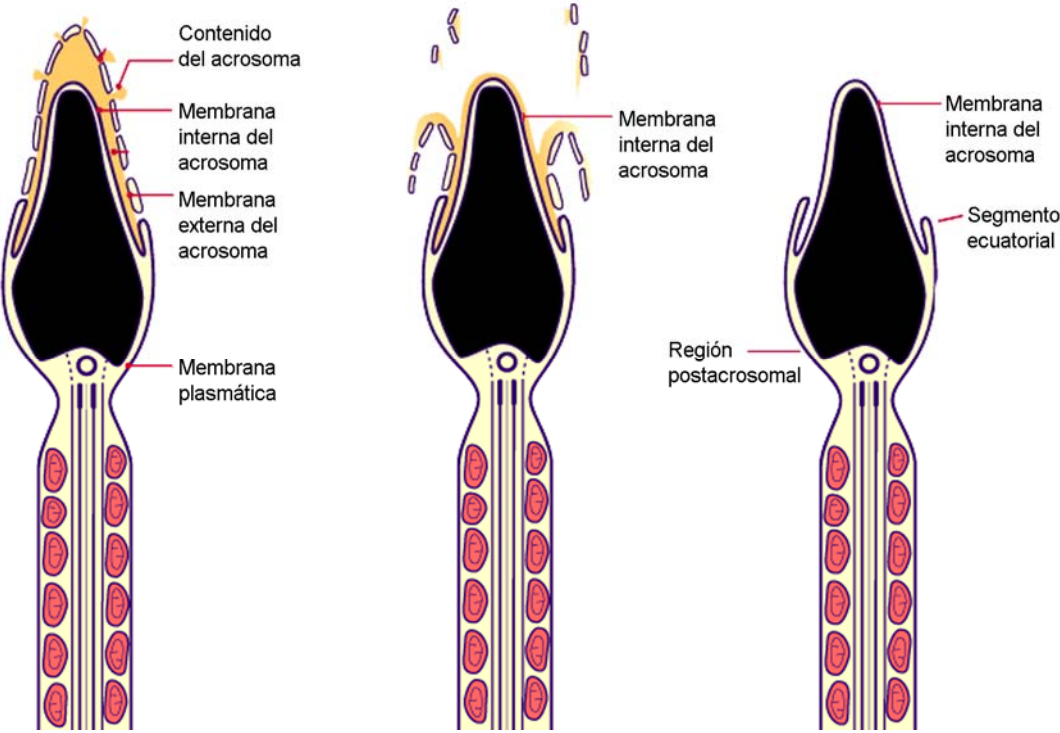


Figura 4. La reacción acrosómica. La membrana plasmática del espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito iniciando la reacción acrosómica. Tras atravesar la zona pelúcida y alcanzar el espacio perivitelino, el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. Extraído de Swanson y Vacquier, 2002.

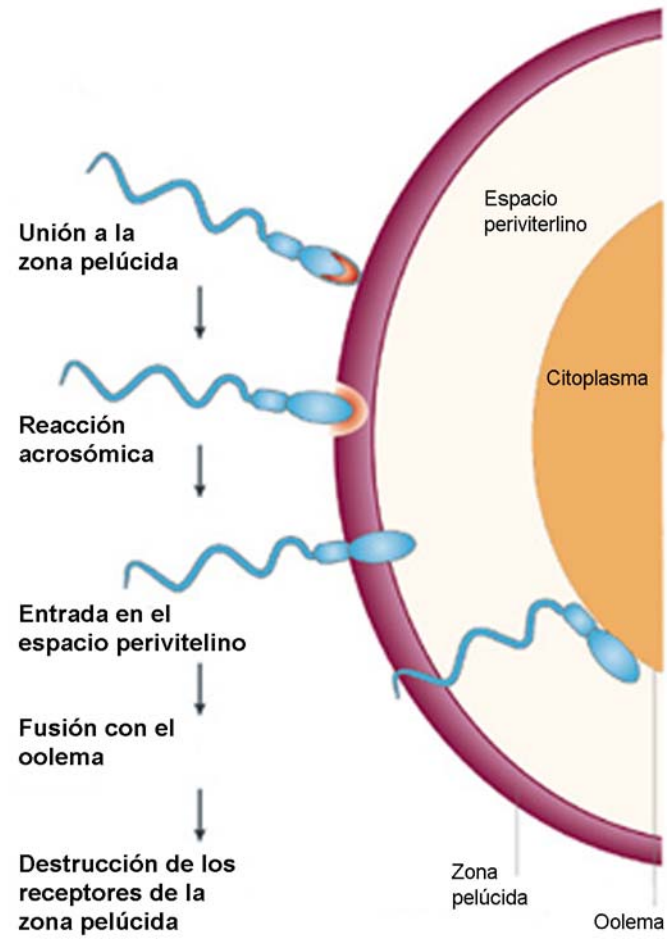


Figura 5. Diferencias morfológicas de los espermatozoides de distintos grupos de marsupiales. Los acrosomas se representan en negro. A. Phalangeridae B. Macropodidae C. Peramelidae D. Dasyúridos y E. koala y wombats. Ilustración original de Temple-Smith (1994). Tomada de *Life of marsupials* de Hugh Tyndale-Biscoe (1973).

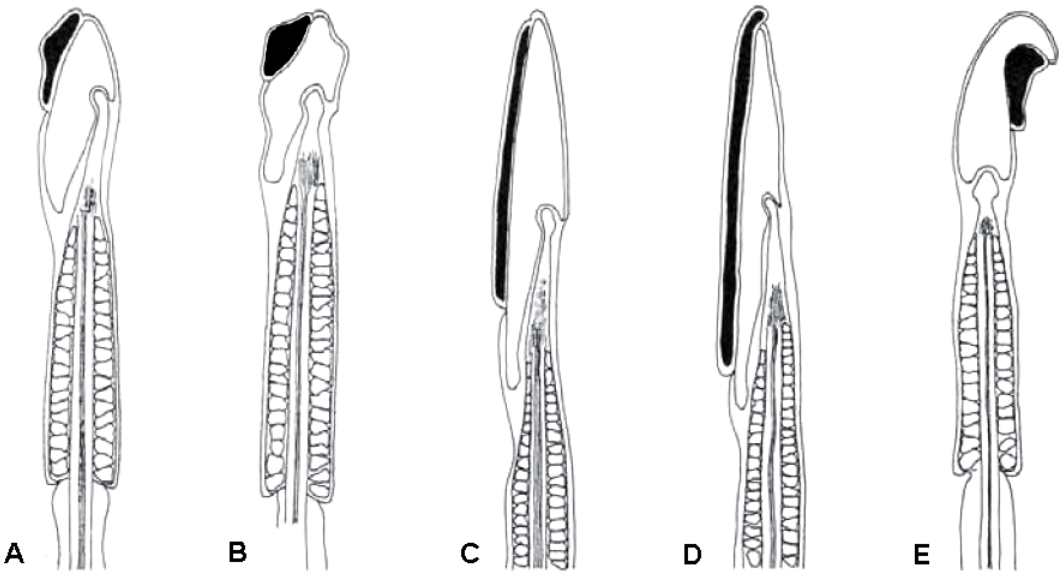


Figura 6. Fases de la espermatogénesis. Las espermatogonias se originan a partir de las células germinales primordiales que migran al testículo durante las primeras etapas de la embriogénesis. Cuando el animal llega a la madurez sexual, las espermatogonias comienzan a proliferar rápidamente, generando algunas células que mantienen la capacidad de continuar dividiéndose indefinidamente (espermatogonias tipo A) y otras (espermatogonias tipo B) que, tras varios ciclos de división mitótica, entran en meiosis dando lugar a espermatocitos primarios (espermatocito I). Los espermatocitos I sufren la primera división meiótica y producen dos espermatocitos secundarios (espermatocitos II). Éstos sufren la segunda división meiótica y producen cuatro espermátidas. Las espermátidas dan lugar a espermatozoides mediante un proceso de diferenciación celular. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

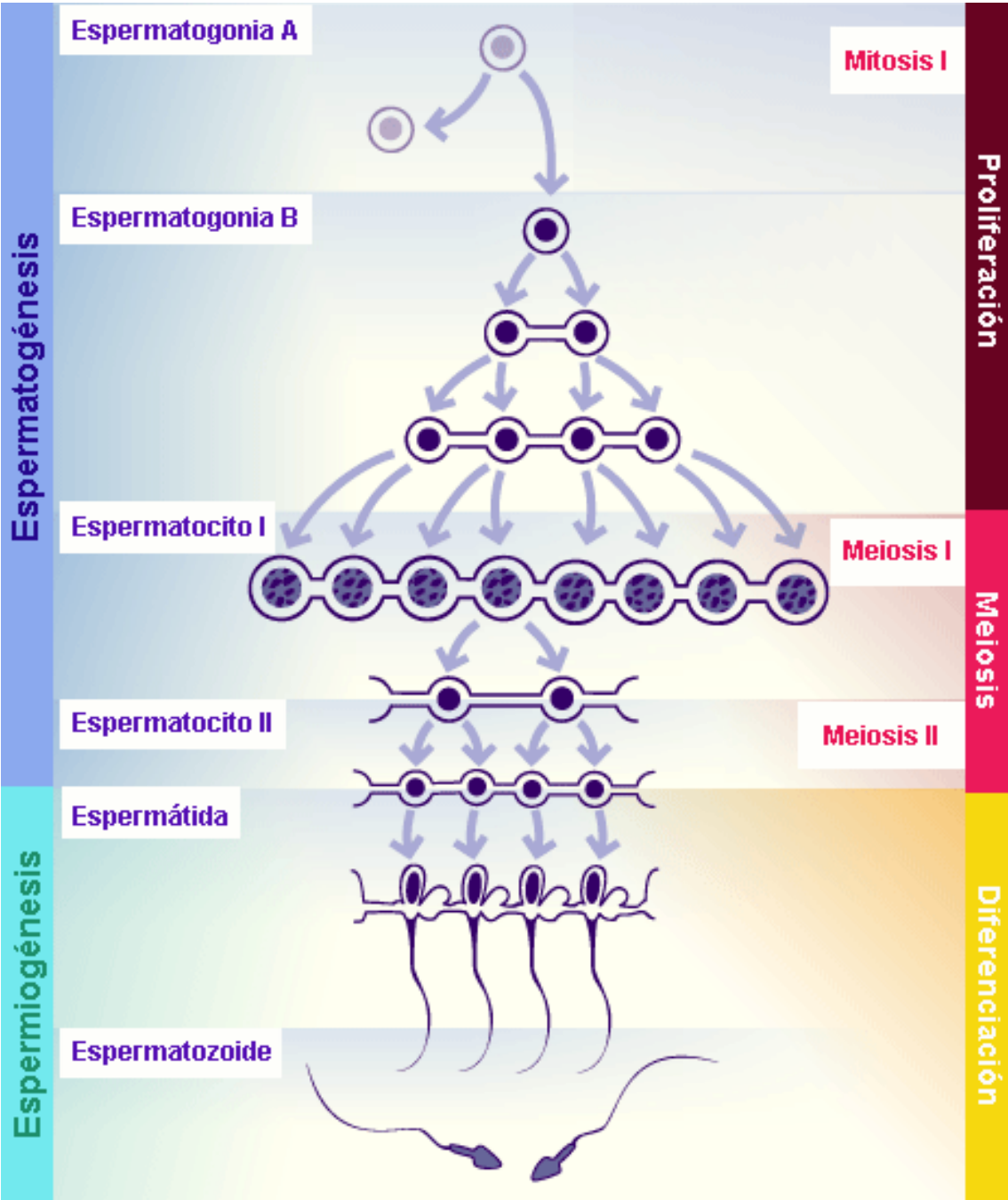


Figura 7. El proceso de diferenciación durante la espermiogénesis. Durante la espermiogénesis, se producen una serie de cambios estructurales muy profundos que implican la transformación de una espermatida redonda en un espermatozoide inmaduro. Estos cambios incluyen: la compactación de la cromatina, la formación del acrosoma, la pérdida de muchos de los componentes celulares del citoplasma y el desarrollo del flagelo. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

Figura 8. La estructura del testículo. El testículo está rodeado por una capa de tejido conectivo llamada capa albugínea, que se extiende hacia el interior del órgano formando septos que dividen el testículo en lóbulos. Cada lóbulo contiene de 1 a 4 túbulos seminíferos que convergen en la *rete testis*. De esta red testicular salen los conductos eferentes que conectan con el epidídimo y éste finalmente contacta con el conducto deferente. El epidídimo está subdividido en tres regiones, *caput*, *corpus* y *cauda*. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

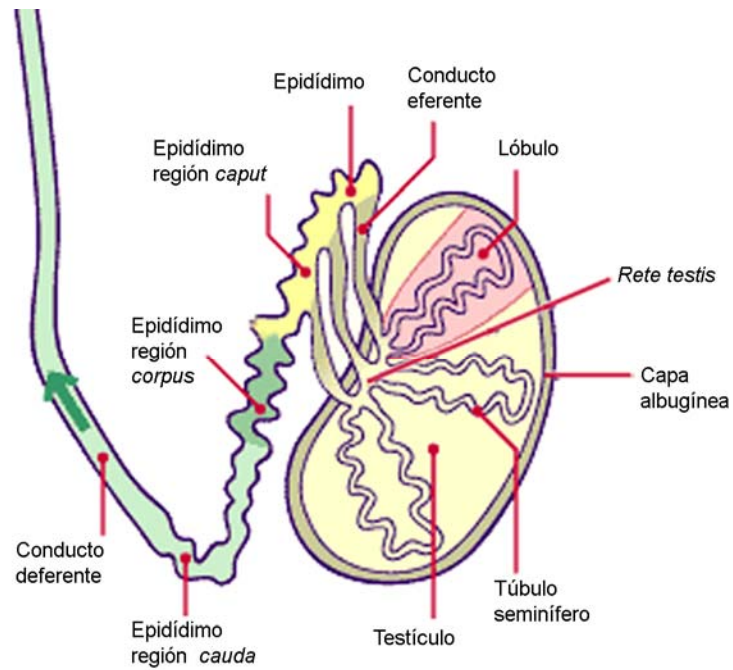
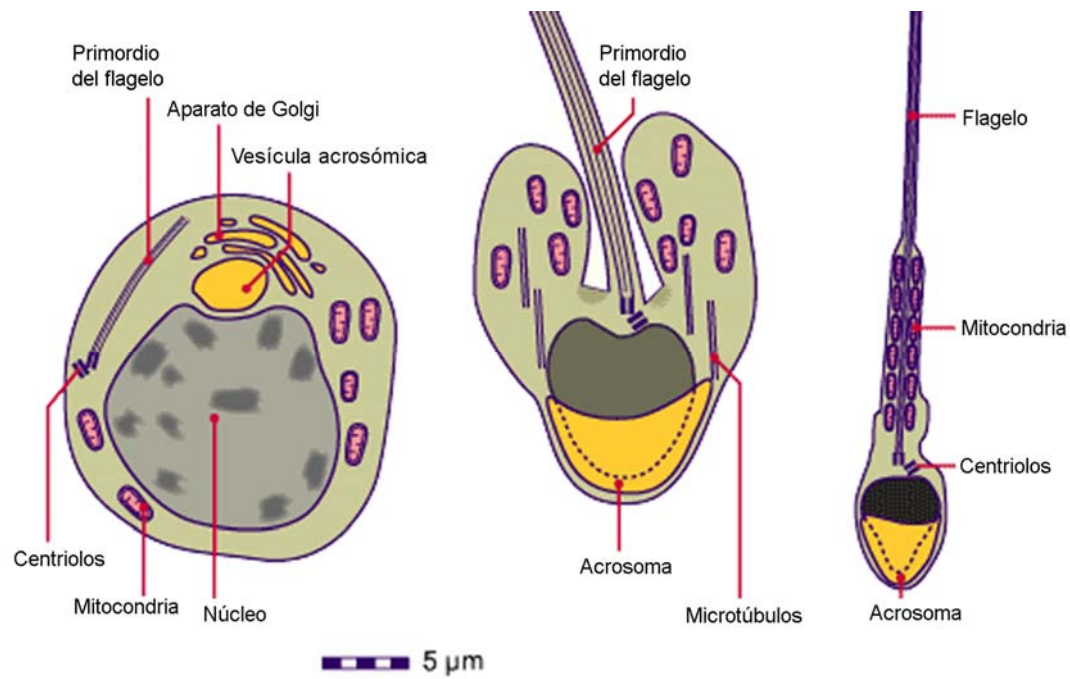


Figura 9. El epitelio seminífero. Las células de Sertoli forman una única capa de células que están unidas entre sí por uniones oclusivas. El citoplasma de estas células está rodeado por las células espermatogénicas. Las uniones oclusivas de las células de Sertoli dividen el epitelio seminífero en dos compartimentos: el basal, en el que están dispuestas las espermatogonias y el luminal en el que se encuentran el resto de las etapas de la espermatogénesis. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

Figura 10. Corte transversal de un túbulo seminífero. Pertenece a un tití de Pinceles Negro (*Callithrix penicillata*), un pequeño primate de la familia Callithricidae de los primates del Nuevo Mundo. Se observan células agrupadas en distintas etapas del proceso de espermatogénesis desde espermatogonias hasta espermátidas alargadas. Barra= 40 µm. Extraído de Leal y Franca (2006).

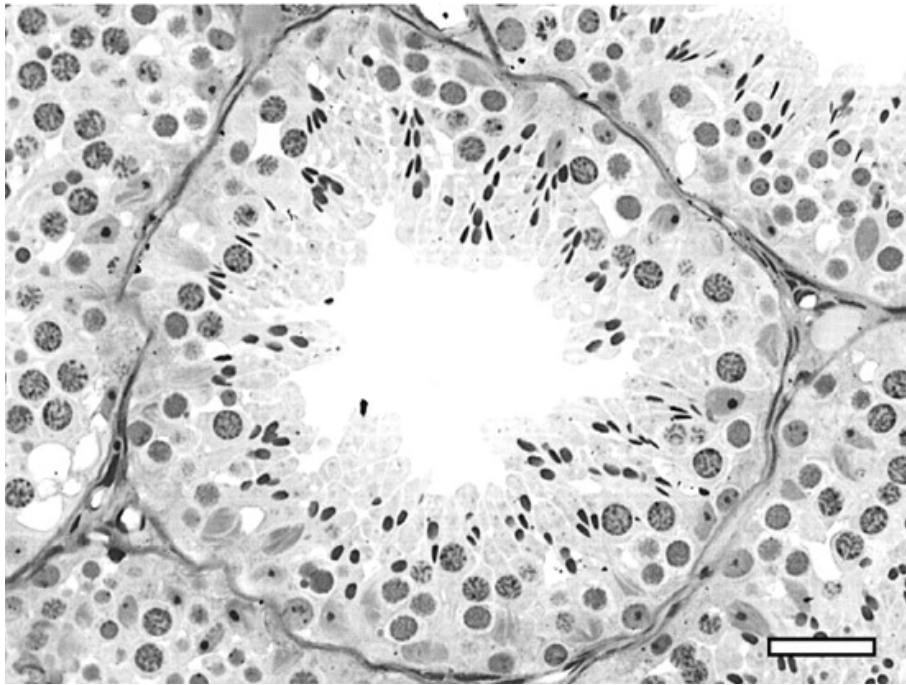
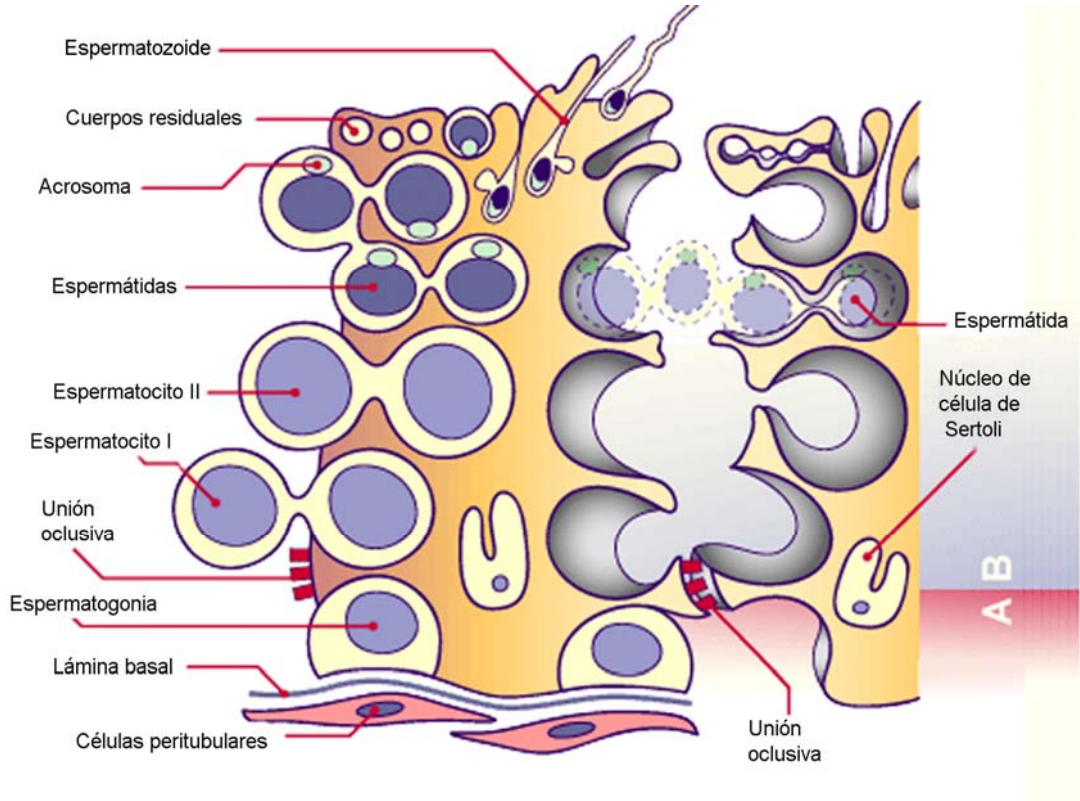


Figura 11. Tres ciclos de espermatogénesis en un túbulo seminífero. Los ciclos de espermatogénesis se mueven en espiral, hacia la luz del túbulo. En la periferia del tubo y al comienzo de la espiral están las espermatogonias y, al final de la espiral próximas a la luz, están los espermatozoides. En el transcurso del tiempo, la ola de espermatogénesis se mueve hacia la derecha para empezar de nuevo otra vez. Es fácil ver en el esquema cómo distintos ciclos o generaciones pueden encontrarse en la misma sección del túbulo. Extraído de <http://www.embryology.ch>.

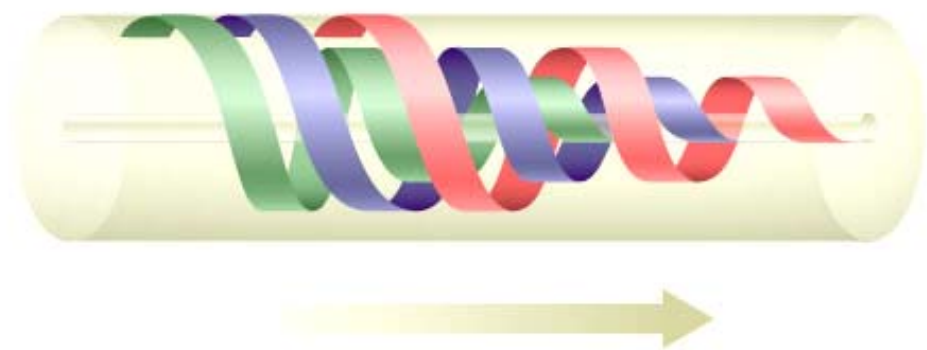


Figura 12. Niveles de empaquetamiento de la cromatina de las células somáticas y los espermatozoides. En las células somáticas, aproximadamente 200 pares de bases de ADN (A) rodean dando casi dos vueltas, un octámero de histonas formando unas estructuras llamadas nucleosomas (B). A su vez estos nucleosomas se enrollan en hélices regulares de seis nucleosomas por vuelta formando la fibra de 30 nm (C). El ADN en esta fibra con forma de solenoide está unido cada 60 kb a la matriz nuclear formando bucles (D). En las células somáticas, estos bucles, contenidos dentro del núcleo, pueden visualizarse fuera de él mediante la extracción de las histonas (E). En el caso del espermatozoide, las protaminas se unen al ADN neutralizando las cargas negativas del ADN (G). El complejo ADN-protaminas se organiza en círculos concéntricos (H). Los círculos de un bucle se pliegan en una estructura toroidal (I) en la cual los complejos ADN-protaminas están unidos por fuerzas de Van der Waals (I, detalle). Cada toroide representa un bucle de ADN unido a la matriz nuclear (J). Los bucles de ADN de los núcleos espermáticos son más pequeños que los de las células somáticas (E-J). Los toroides están conectados entre sí mediante regiones de cromatina más sensibles a agentes dañinos como la ADNasa I, llamadas *toroid linkers* o *conectores* (K). La estructura interna de las fibras de ADN-protaminas dentro del toroide, comparada con la de las células somáticas, parece que proporciona una mayor protección frente a agentes dañinos pues la mayoría de las fibras de ADN y protaminas (fibras internas) están dispuestas en el interior del toroide (K). De acuerdo con este modelo, los *conectores* serían las regiones con más posibilidades de daño de ADN en los espermatozoides maduros. Extraído de Ward (1993) y De Jonge y Barratt (2006) *The Sperm Cell*, modificado a partir del modelo de Sotolongo y col. (2003).

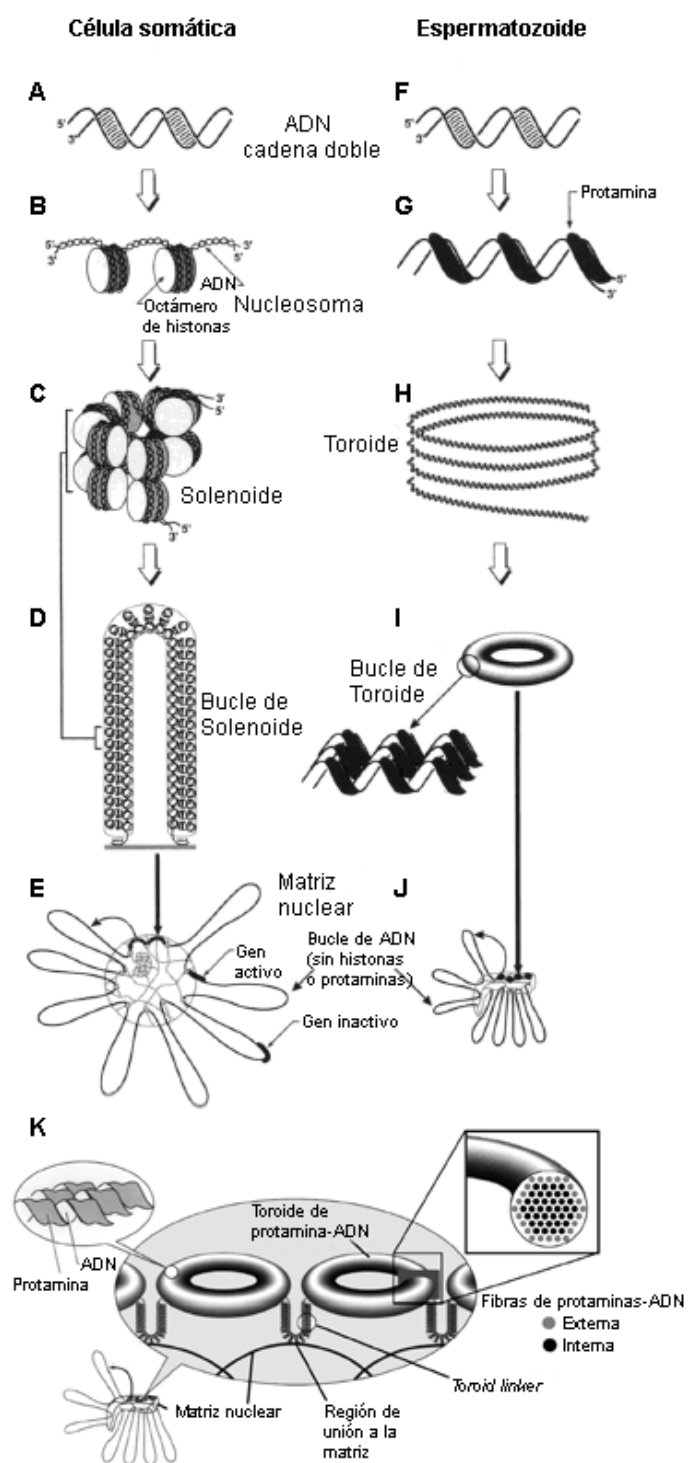


Figura 13. Modelo hipotético de la eliminación de los superenrollamientos durante la espermiogénesis. En cada bucle de ADN la eliminación de los nucleosomas deja superenrollamientos libres entre los puntos de anclaje del bucle. Los superenrollamientos entre estos puntos son eliminados mediante roturas de ADN de cadena doble o sencilla producidas por un mecanismo desconocido por el momento. La siguiente eliminación de nucleosomas en otras regiones topológicamente constreñidas del bucle deja superenrollamientos libres que son eliminados de manera similar. Finalmente, la deposición de las proteínas de transición y de las protaminas estimula la reparación de las roturas de ADN estabilizando el ADN en una estructura sin superenrollamientos (Boissonneault, 2002).

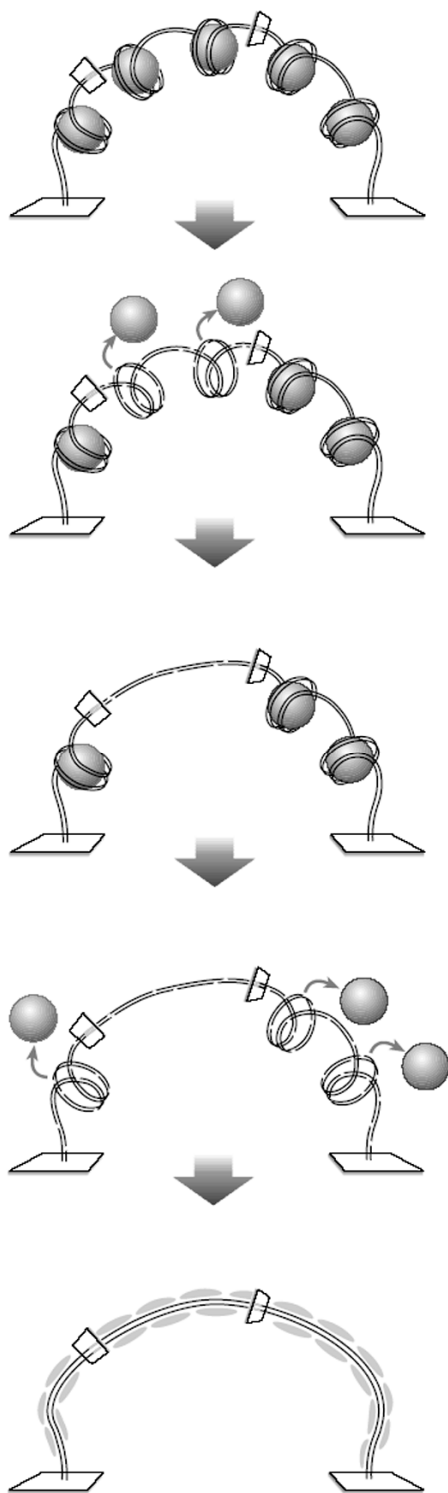


Figura 14. Test SCD en espermatozoides humanos. (a) Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos mediante el test SCD teñidos con Wright. (b) Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos mediante el test SCD teñidos con DAPI.

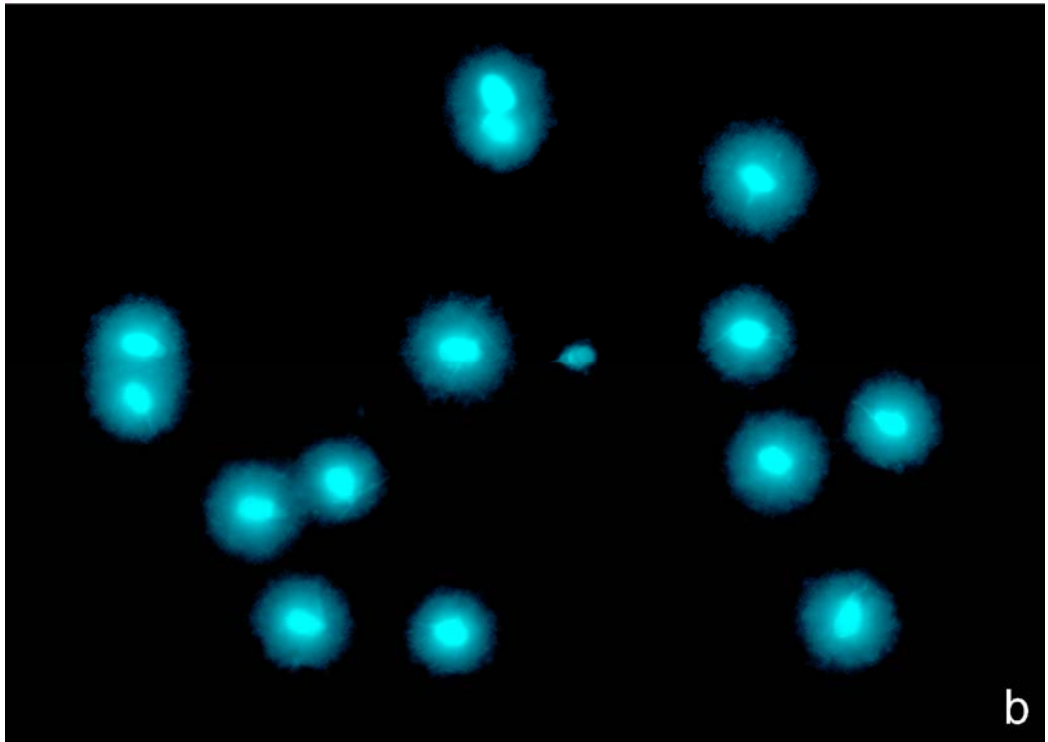


Figura 15. Tipos de espermatozoides humanos presentes en una muestra procesada con el test SCD. (a) Teñidos con Wright. **(b)** Teñidos con DAPI y mercuridibromofluoresceína.

Figura 16. DBD-FISH realizado sobre espermatozoides humanos procesados con el test SCD para demostrar la presencia de roturas de ADN. (a) Espermatozoides humanos procesados con el test SCD teñidos con DAPI. **(b)** Señal de hibridación del ensayo DBD-FISH correspondiente a los espermatozoides humanos de (a) realizado con una sonda de ADN genómico humano. Los nucleoides con halo pequeño, sin halo y degradados tienen el ADN nuclear fragmentado.

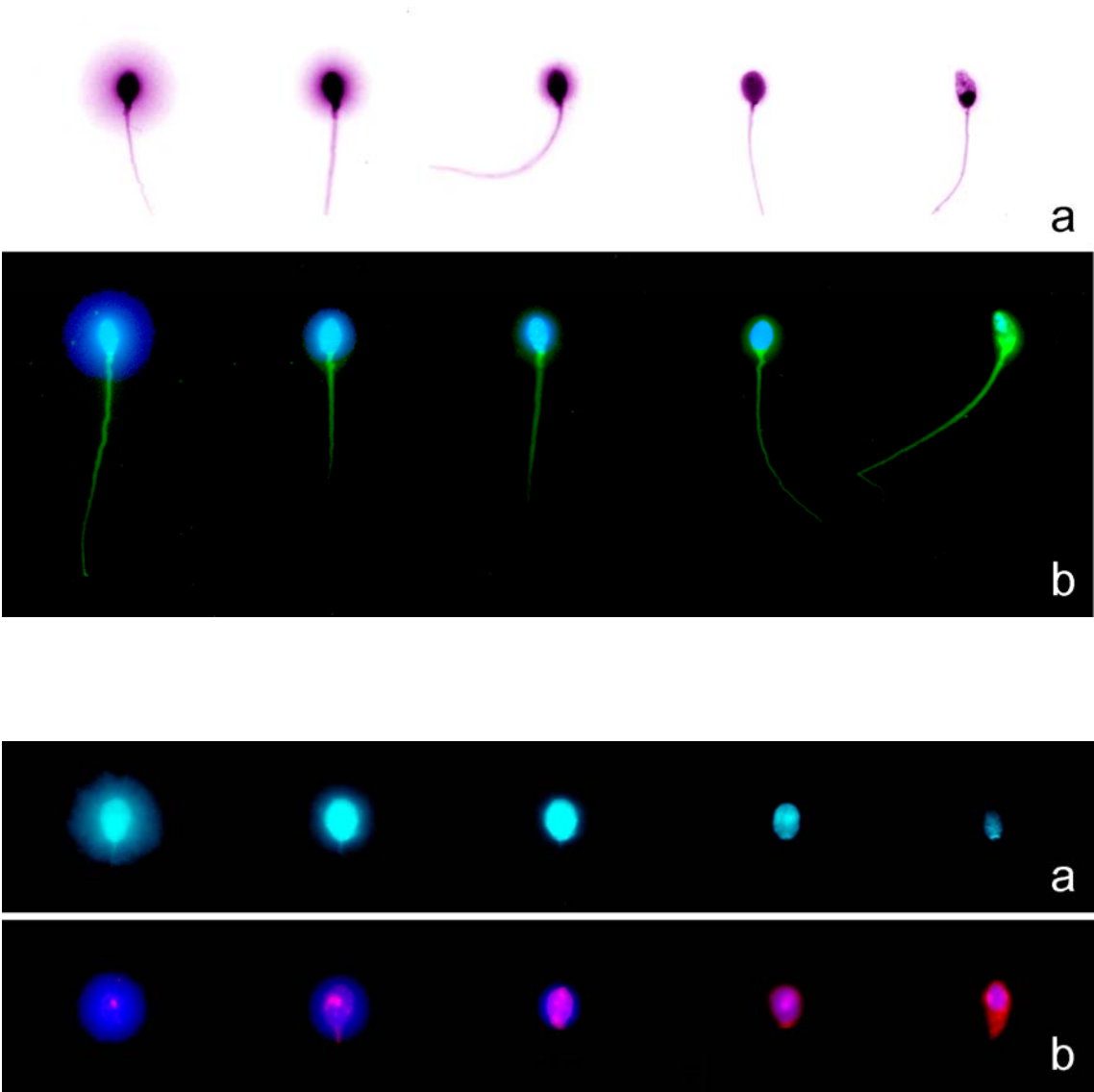


Figura 17. Análisis digital de imágenes. Definición de las regiones del campo de visión que se desea medir. **(a)** Espermatozoides teñidos con DAPI. **(b)** Los mismos espermatozoides detectados con el programa de análisis de imagen *Leica Qwin Pro*. **(c)** Los mismos espermatozoides detectados con el programa de análisis de imagen *Volocity*.

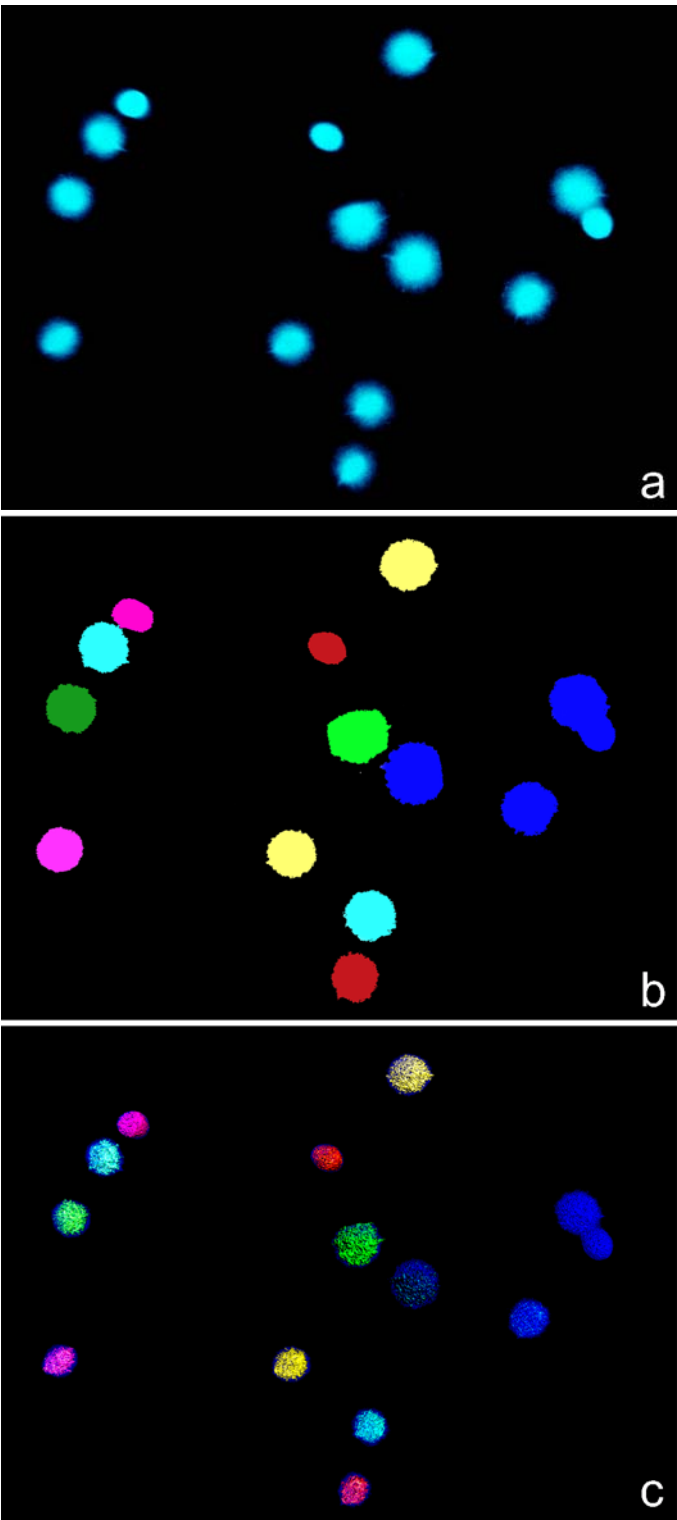
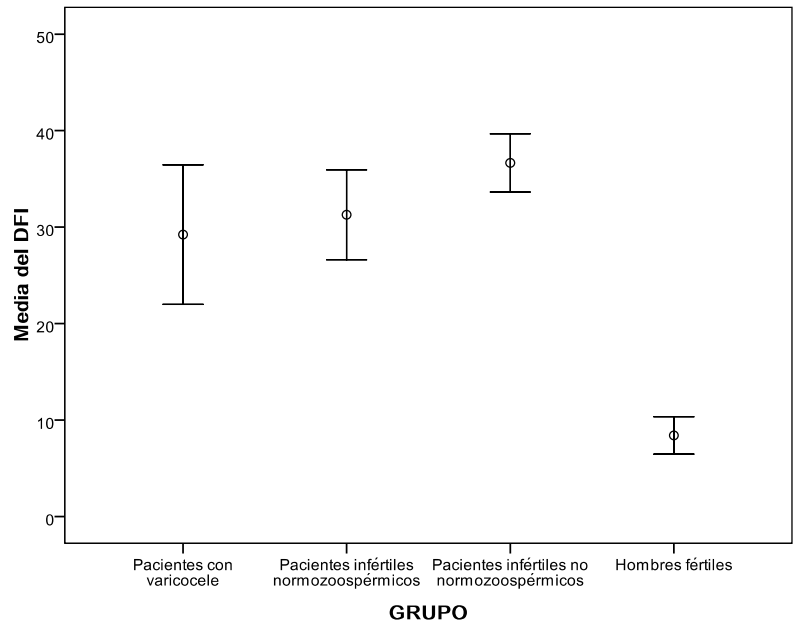
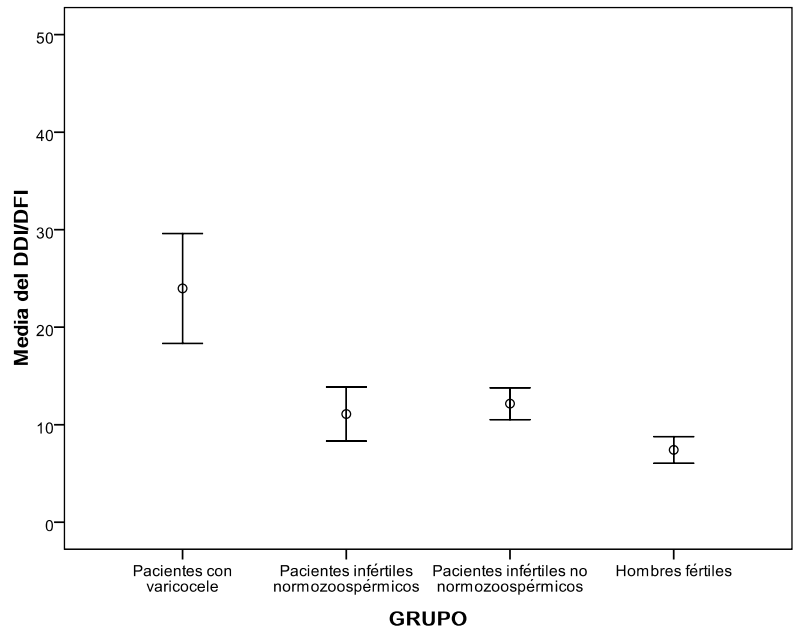


Figura 18. Índices de fragmentación y de degradación en los grupos de estudio. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) de las muestras de semen de pacientes infértiles con varicocele, pacientes infértiles normozoospermicos, pacientes infértiles con parámetros seminales anormales y hombres fértiles. Los tres grupos de pacientes infértiles tienen DFIs significativamente (U Mann Whitney, $p < 0,05$) distintos de los del grupo de hombres fértiles pero estadísticamente iguales entre sí. **(b)** Índice de degradación de ADN en el total de células fragmentadas (DDI/DFI) de las muestras de semen de pacientes infértiles con varicocele, pacientes infértiles normozoospermicos, pacientes infértiles con parámetros seminales anormales y hombres fértiles. El grupo de pacientes con varicocele tiene un DDI/DFI significativamente (U Mann Whitney, $p < 0,05$) distinto del resto de los grupos analizados.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

b

Figura 19. El test SCD en muestras de pacientes con varicocele. (a) Muestra de semen de un individuo fértil que presenta sólo un espermatozoide con el ADN fragmentado en el campo del microscopio. (b) Muestra de semen de un individuo con varicocele que presenta siete espermatozoides con el ADN fragmentado en el campo del microscopio. Cuatro de ellos corresponden a espermatozoides degradados, con tinción leve o irregular del *core* residual. Además, se distinguen fácilmente dos células no espermáticas, con núcelos grandes y sin flagelo. (c) Espermatozoide con el ADN intacto. (d) Espermatozoide con el ADN fragmentado, sin halo. (e-i) Espermatozoides degradados con un alto nivel de fragmentación de ADN.

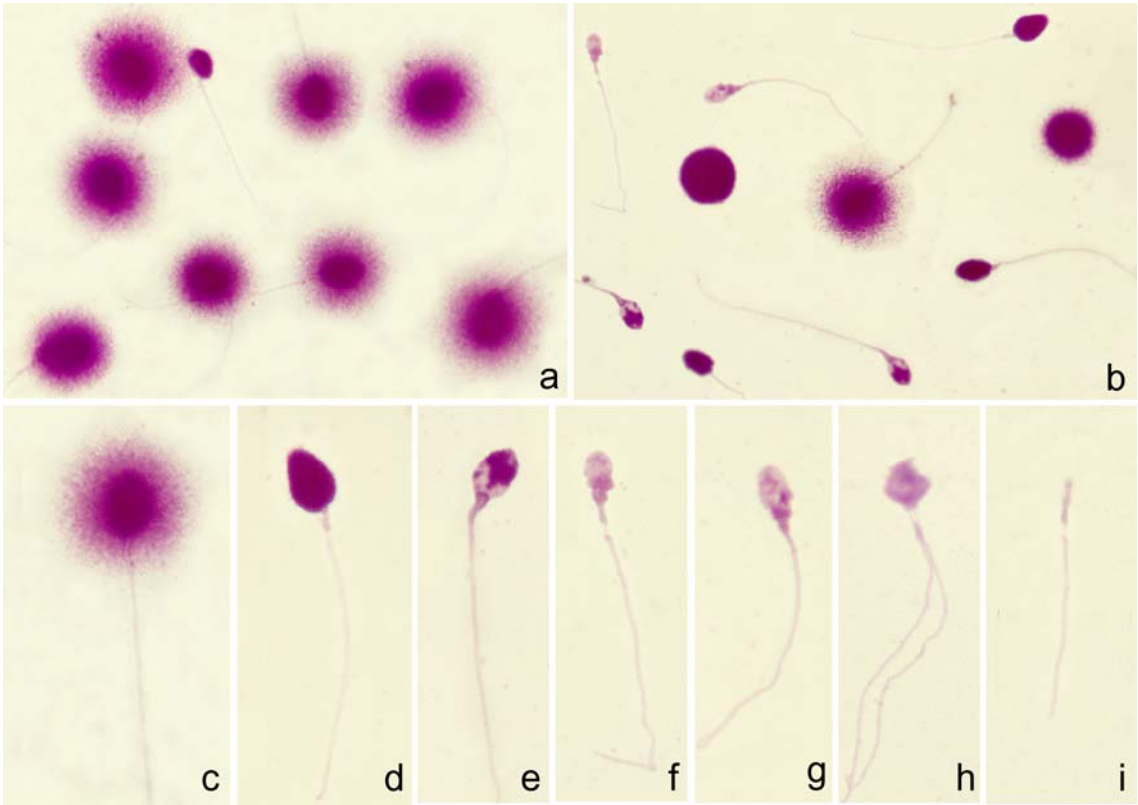
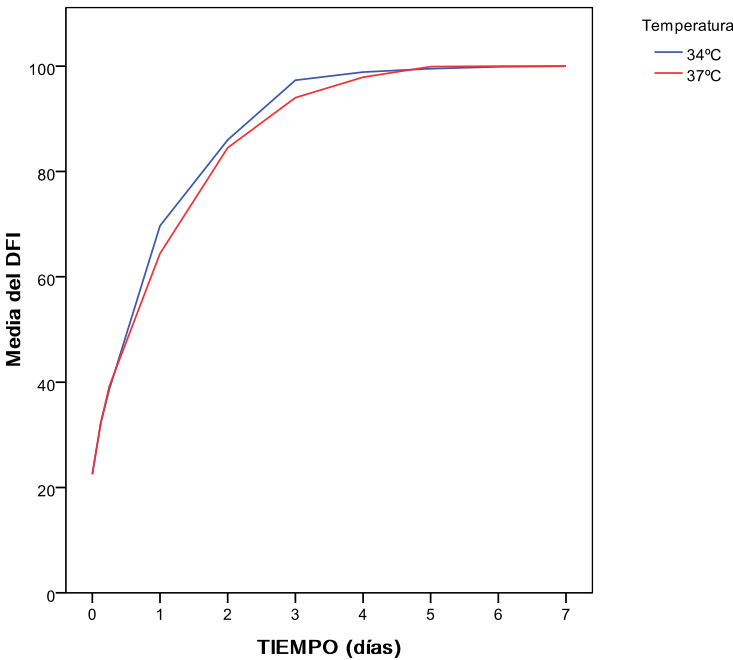
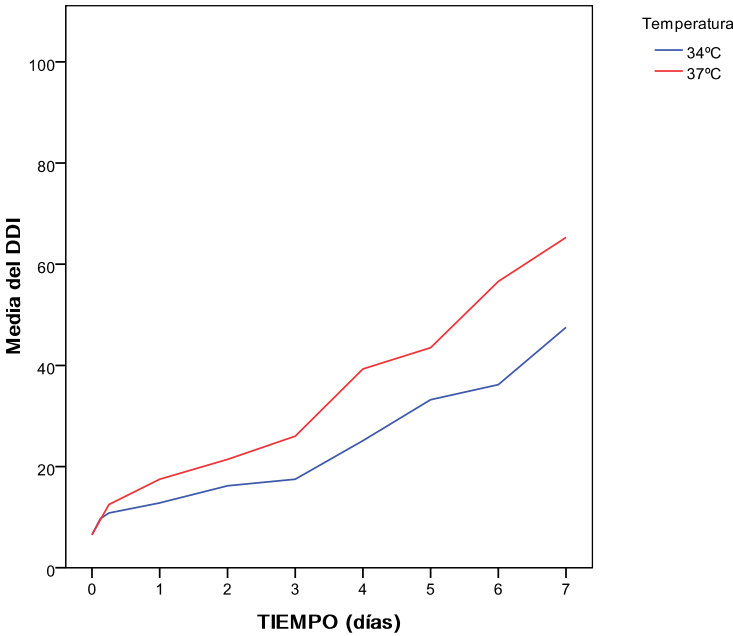


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la integridad del ADN. (a) Efecto de la temperatura sobre la fragmentación del ADN de 10 muestras de semen pertenecientes a individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a 34 y 37°C. (b) Efecto de la temperatura sobre la degradación del ADN de 10 muestras de semen pertenecientes a individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a 34 y 37°C.

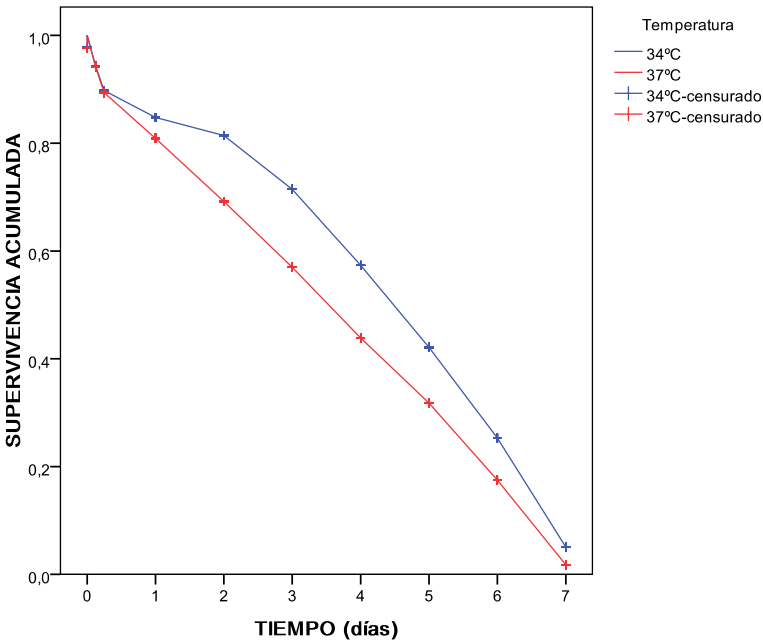


a

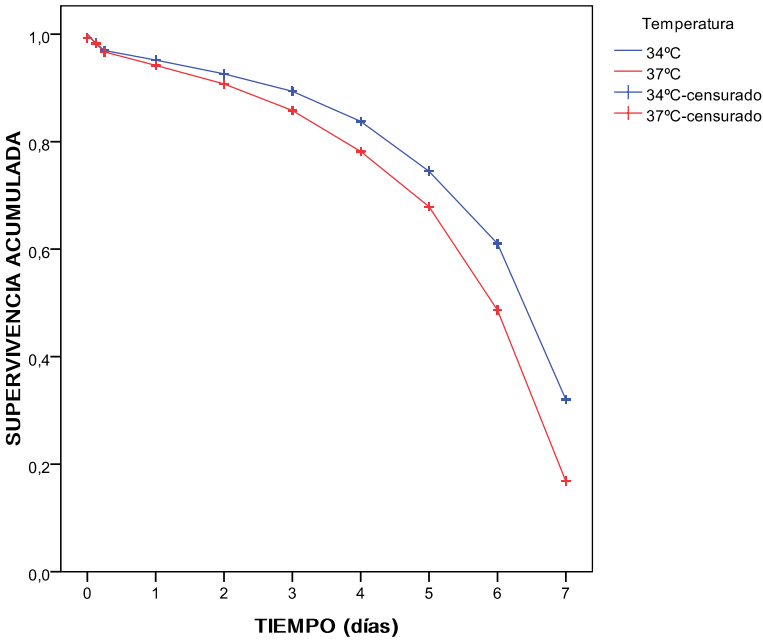


b

Figura 21. Curvas de supervivencia: efecto de la temperatura. (a) Curvas de supervivencia a distintas temperaturas 34° y 37°C construidas a partir de los datos de fragmentación. El test estadístico de Breslow indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas de supervivencia. (b) Curvas de supervivencia a distintas temperaturas 34° y 37°C construidas a partir de los datos de degradación. El test estadístico de Breslow indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las curvas de supervivencia.

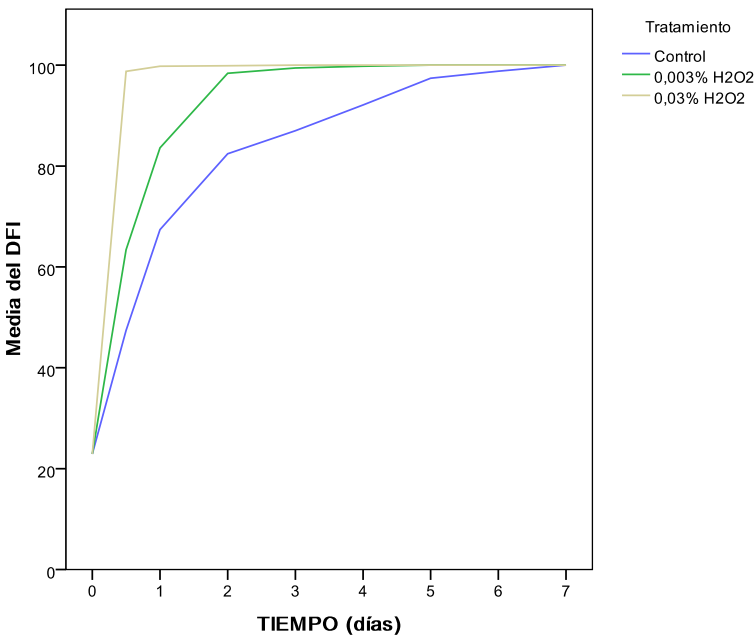


a

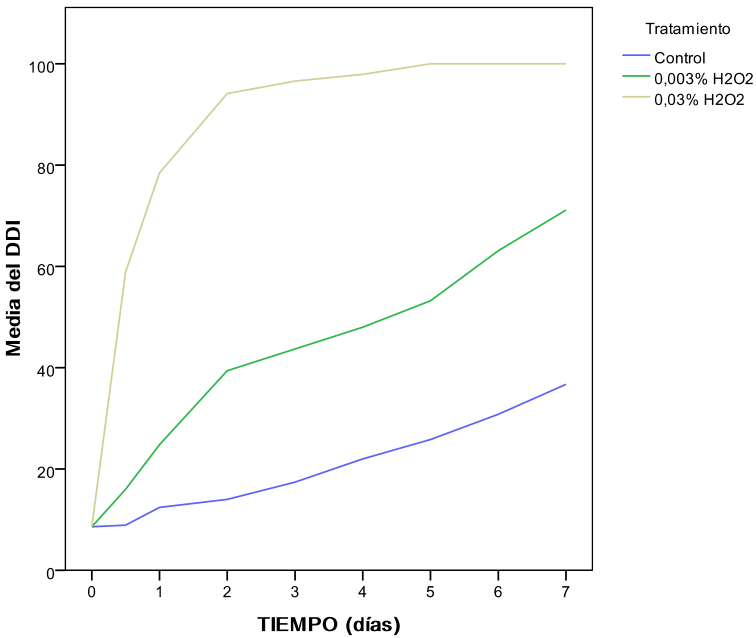


b

Figura 22. Efecto del estrés oxidativo sobre la integridad del ADN. (a) Efecto del estrés oxidativo sobre la fragmentación del ADN de 10 muestras de semen pertenecientes a individuos normozoospermicos incubadas en concentraciones crecientes de H_2O_2 . (b) Efecto del estrés oxidativo sobre la degradación del ADN de 10 muestras de semen pertenecientes a individuos normozoospermicos incubadas en concentraciones crecientes de H_2O_2 .

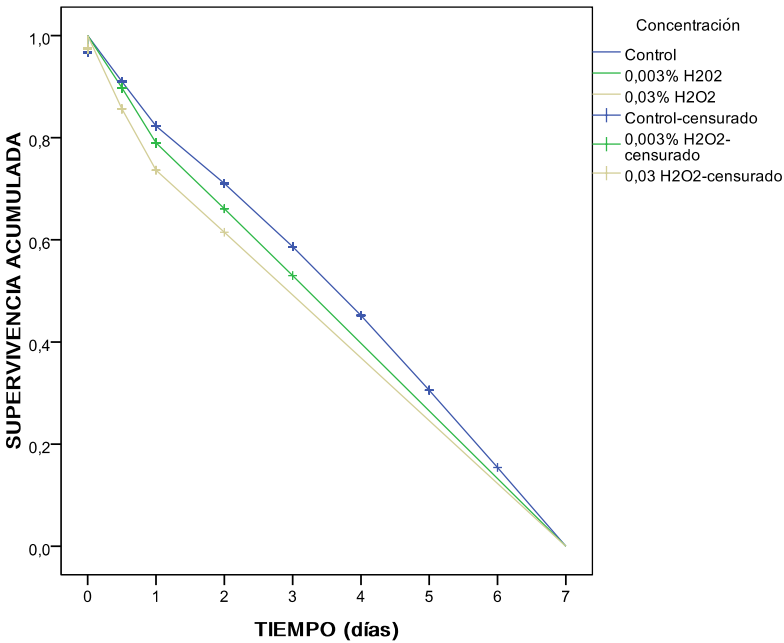


a

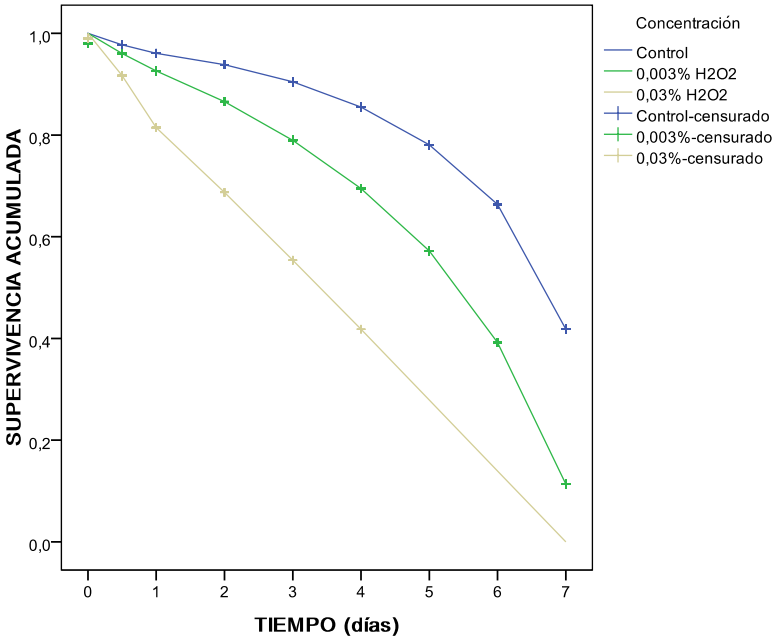


b

Figura 23. Curvas de supervivencia: efecto del estrés oxidativo. (a) Curvas de supervivencia a distintas concentraciones de H_2O_2 construidas a partir de los datos de fragmentación. El test estadístico de Breslow indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las curvas de supervivencia. A concentraciones altas de H_2O_2 la supervivencia se ve más afectada. (b) Curvas de supervivencia a distintas concentraciones de H_2O_2 construidas a partir de los datos de degradación. El test estadístico de Breslow que indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las curvas. A concentraciones altas de H_2O_2 la supervivencia se ve más afectada.



a



b

Figura 24. El ensayo cometa en dos dimensiones (2D) en espermatozoides humanos. Tipos de espermatozoides obtenidos cuando una muestra se procesa con el ensayo cometa 2D: 1, espermatozoide sin roturas; 2, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla; 3, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla; 4, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena doble; 5, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena doble; 6, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla y doble; 7, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla y doble. **(a)** Tipos de cometa 2D teñidos con Sybr green. **(b)** Las mismas imágenes después de la aplicación de un filtro digital.

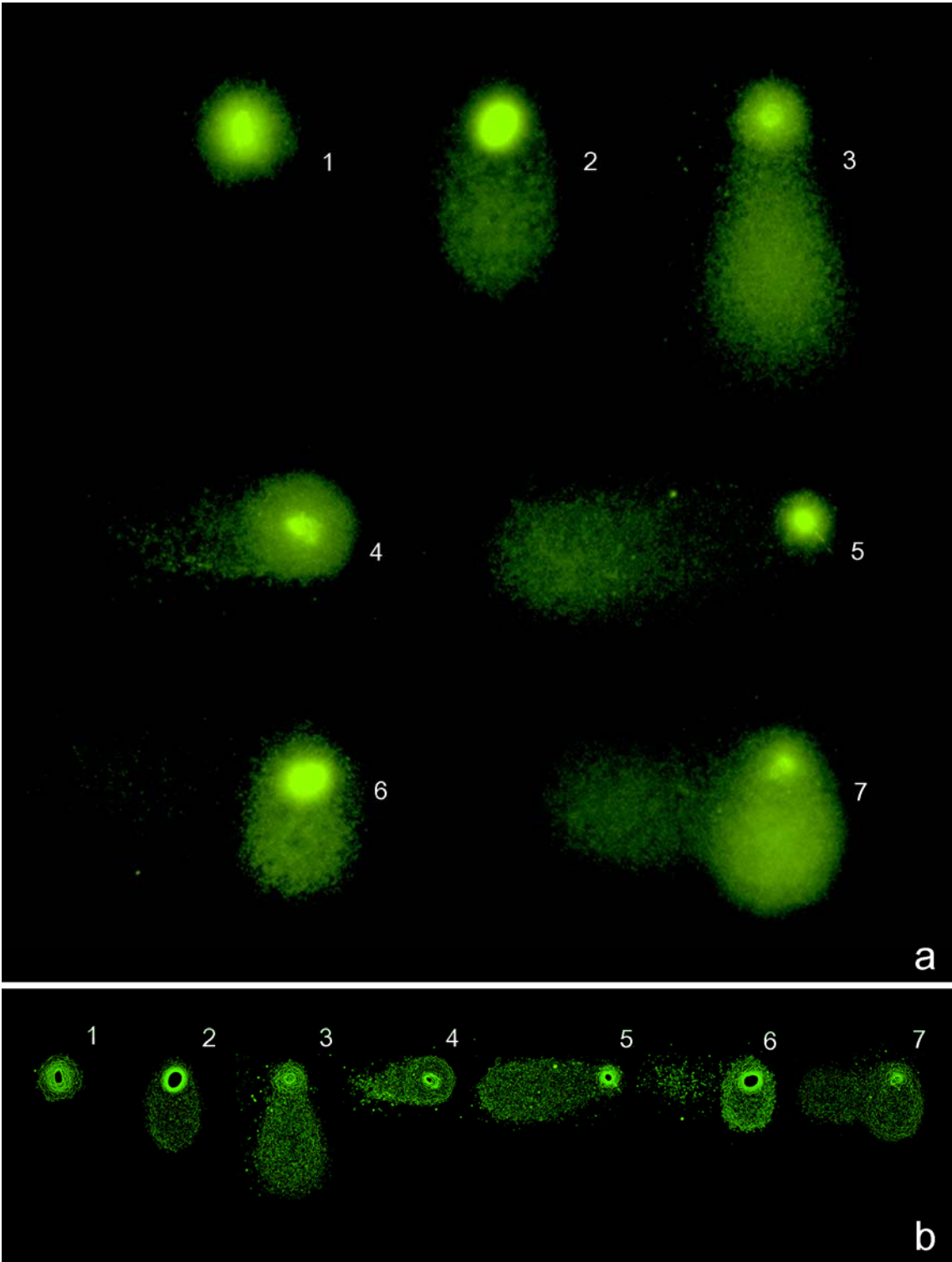


Figura 25. Detección de ADN de cadena sencilla mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y tinción con naranja de acridina. (a) Detección de ADN de cadena sencilla mediante FISH con una sonda de ADN genómico humano (verde) sobre cometas 2D obtenidos a partir de espermatozoides humanos contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). **(b)** La misma imagen después de la aplicación de un filtro digital. **(c)** Tipos de cometa en dos dimensiones (2D) presentes en una muestra de semen normozoospermica sometida primero a una electroforesis neutra (de derecha a izquierda, eje X) y a continuación a una electroforesis alcalina perpendicular a la primera (de arriba abajo, eje Y) teñidos con naranja de acridina 0.5×10^{-4} mol/l. **(d)** Las mismas imágenes después de la aplicación de un filtro digital.

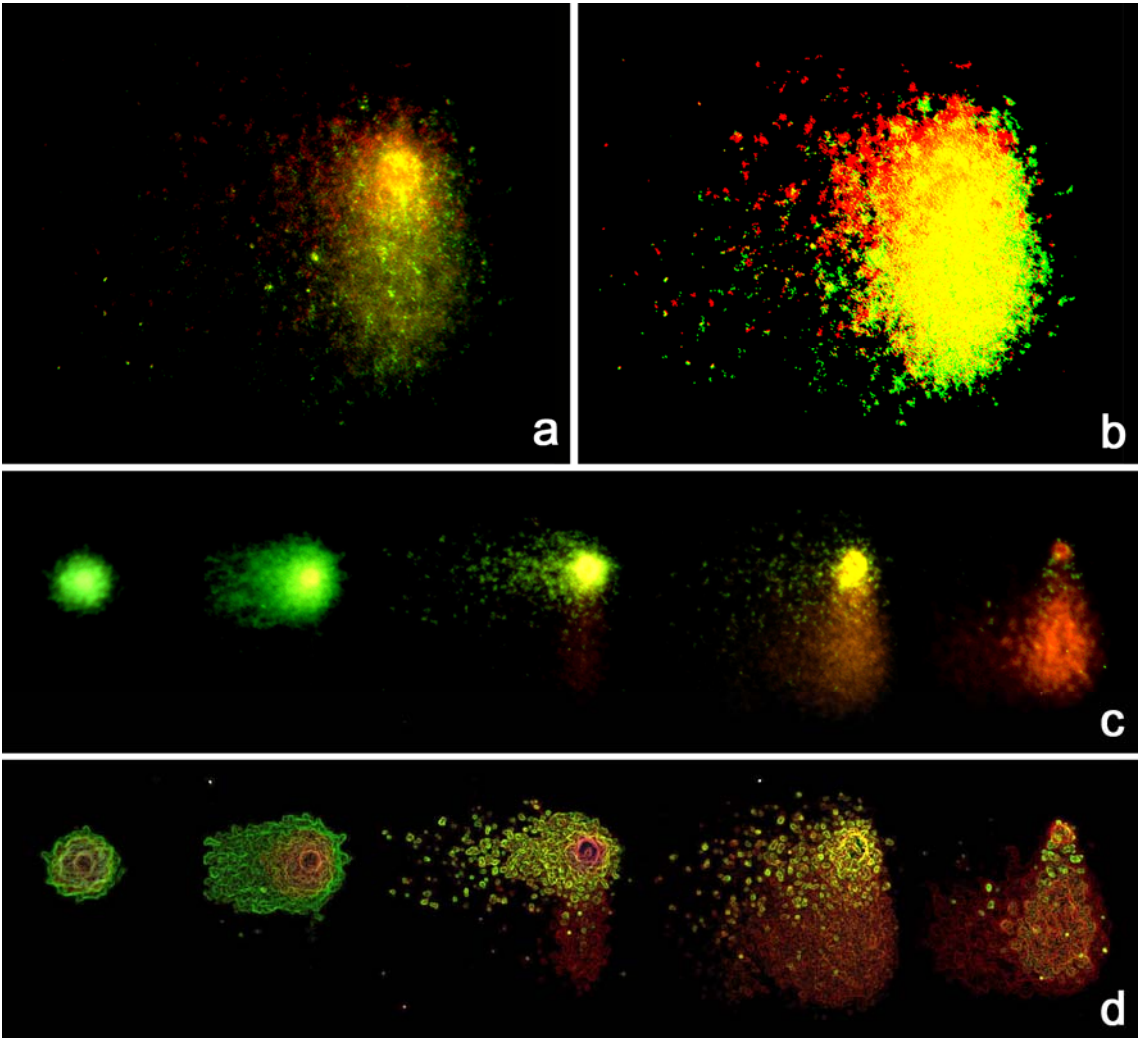
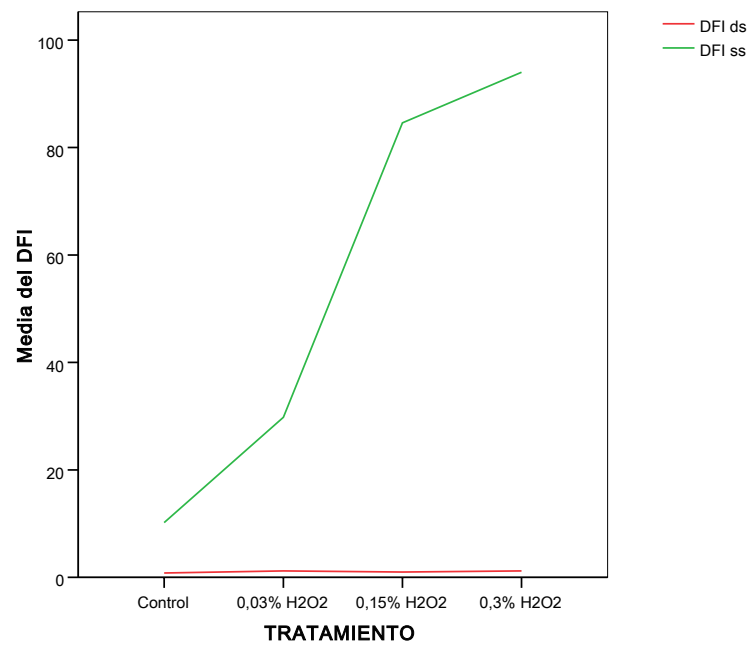
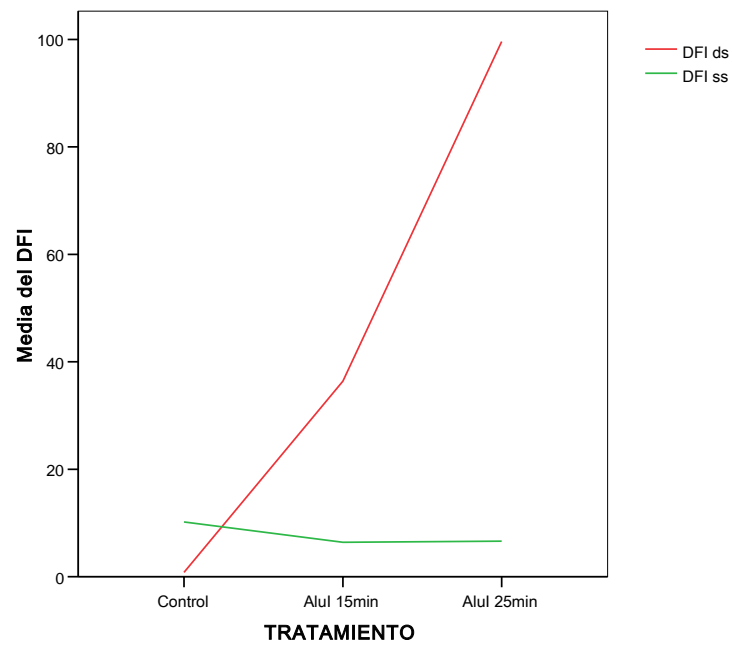


Figura 26. Detección del daño de ADN en espermatozoides. (a) Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de una muestra de semen normozoospermica tratada con concentraciones crecientes de H_2O_2 . Las diferencias en el DFI ss entre las muestras tratadas y el control son significativas (X^2 , $p < 0.05$). (b) Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de la misma muestra de semen digerida con la enzima de restricción Alu I. Las diferencias en el DFI ds entre las muestras tratadas y el control son significativas (X^2 , $p < 0.05$).

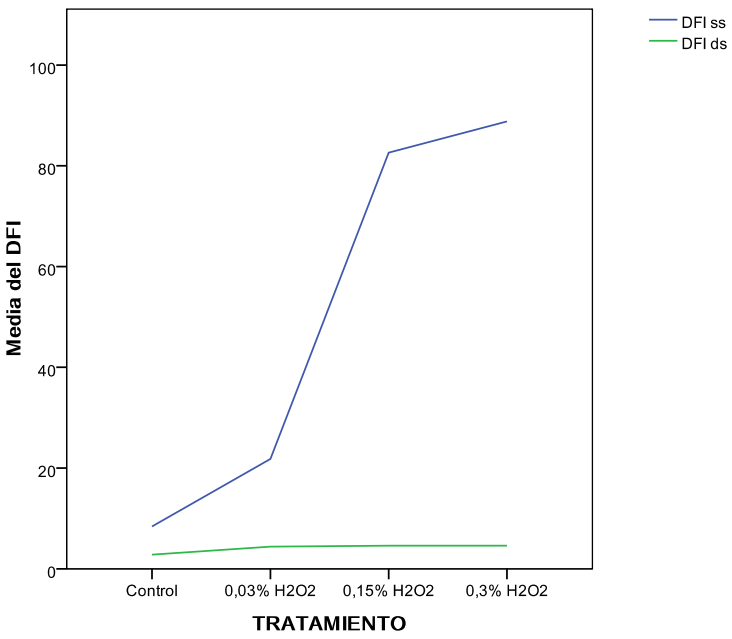


a

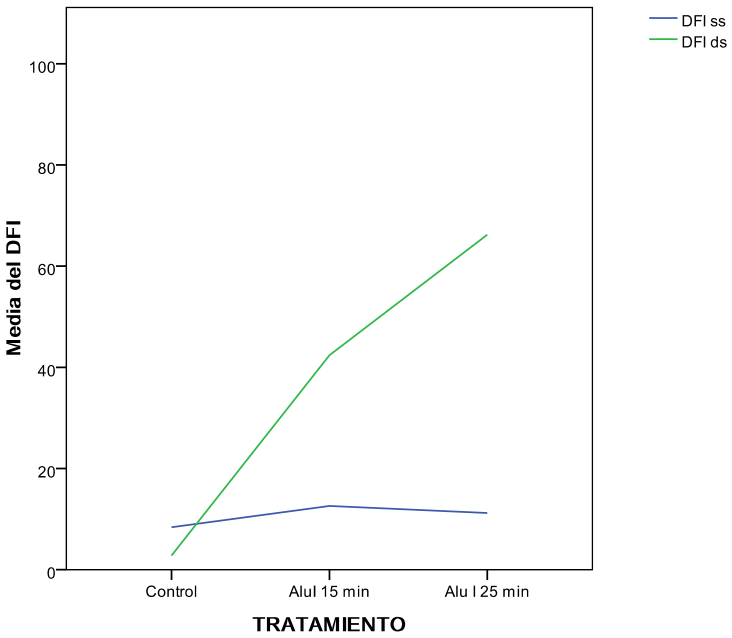


b

Figura 27. Detección del daño de ADN en leucocitos. (a) Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de una muestra de leucocitos humanos tratada con concentraciones crecientes de H_2O_2 . Las diferencias en el DFI ss entre las muestras tratadas y el control son significativas (X^2 , $p < 0.05$). **(b)** Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de la misma muestra de leucocitos humanos digerida con la enzima de restricción Alu I. Las diferencias en el DFI ds entre las muestras tratadas y el control son significativas (X^2 , $p < 0.05$).



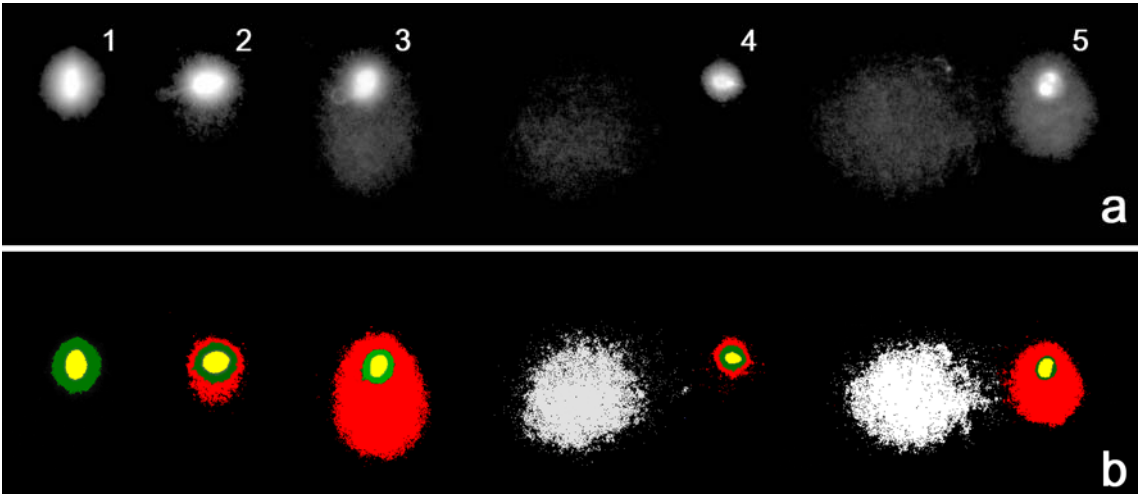
a



b

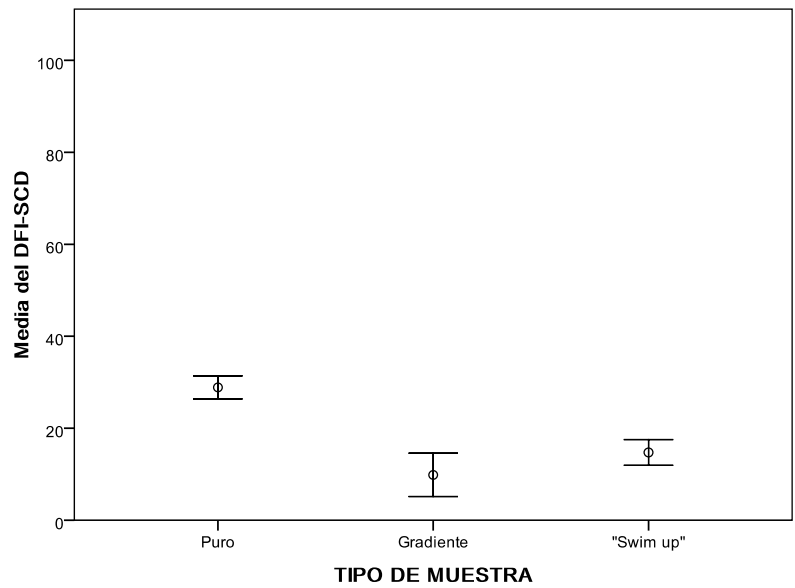
Figura 28. Análisis de imagen digital. Definición de las regiones del campo de visión que se desea medir: 1, espermatozoide sin roturas; 2, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla; 3, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla; 4, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla y un nivel alto de roturas de cadena doble; 5, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla y doble. **(a)** Espermatozoides teñidos con Sybr green. **(b)** Los mismos espermatozoides detectados con el soporte informático *Leica Q Win Pro*.

Figura 29. Motilidad media (%A+B) de las muestras analizadas en semen puro y recuperado mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*. Se encontraron diferencias significativas en la motilidad entre las muestras de semen puro y las recuperadas por ambas técnicas. (U Mann Whitney, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre las muestras de semen recuperadas mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 30. (a) Índice de fragmentación de ADN medio calculado mediante el test SCD (DFI-SCD) en las muestras analizadas en semen puro y recuperado mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI-SCD entre las muestras frescas y recuperadas por ambas técnicas. (b) Índice de degradación de ADN (DDI) medio calculado mediante el test SCD en las muestras analizadas en semen puro y recuperado mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DDI entre las muestras frescas y recuperadas por ambas técnicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

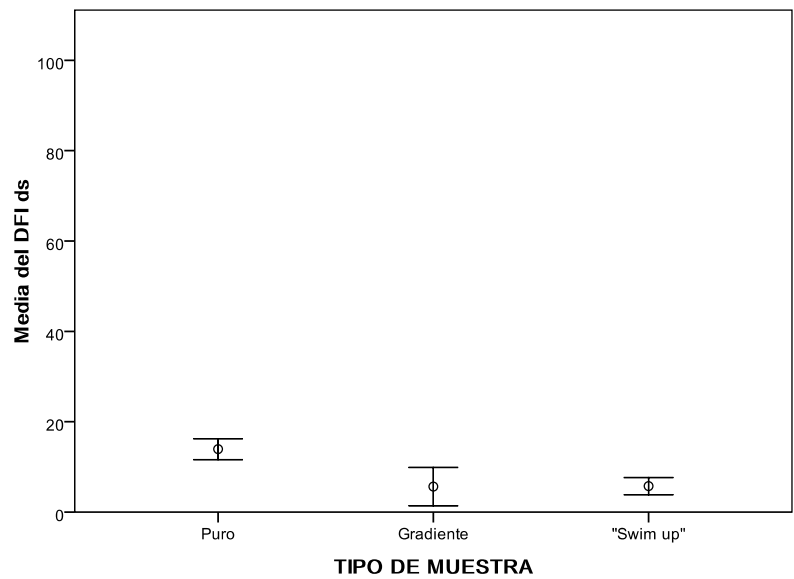
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

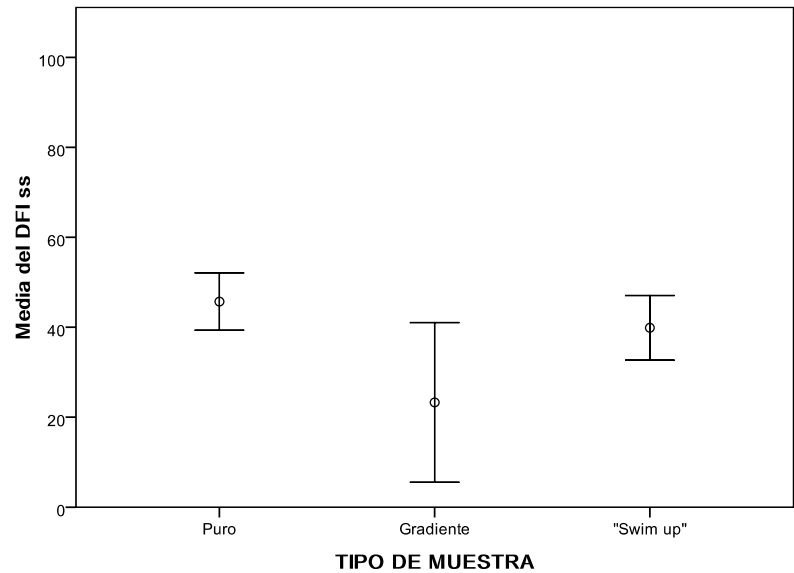
b

Figura 31. (a) Índice de fragmentación de ADN de cadena doble (DFI ds) medio calculado mediante el ensayo cometa 2D en las muestras analizadas en semen puro y recuperado mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ds entre las muestras frescas y recuperadas por ambas técnicas. (b) Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) medio calculado mediante el ensayo cometa en dos dimensiones (2D) en las muestras analizadas en semen puro y recuperado mediante centrifugación en gradiente de densidad y *swim up*. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ss entre las muestras frescas y recuperadas por gradiente de densidad. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras frescas y las recuperadas mediante swim up.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

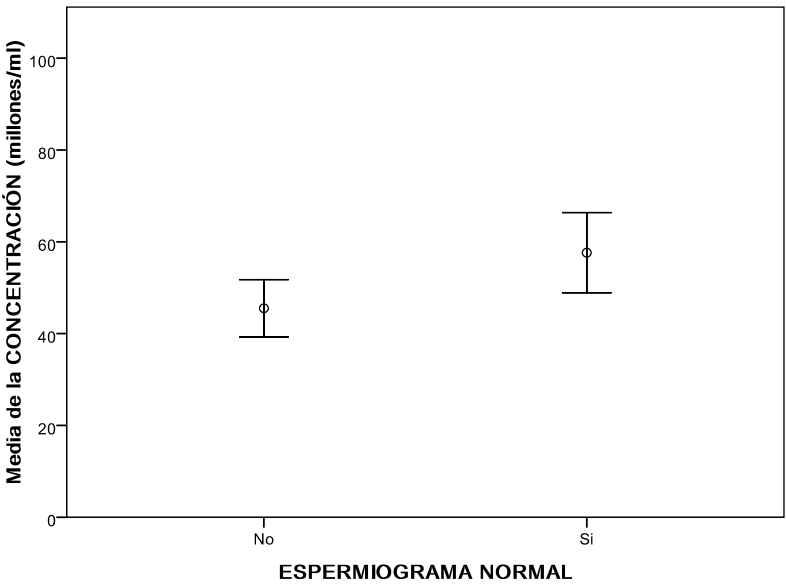
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

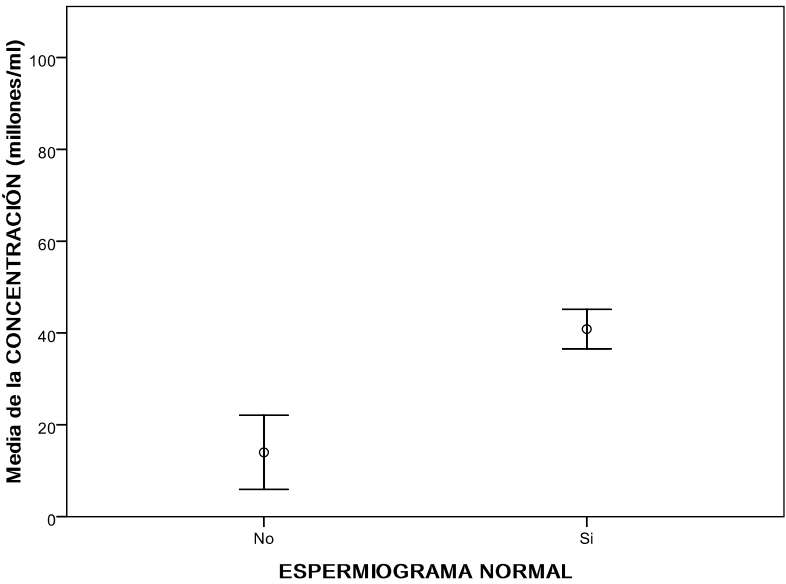
b

Figura 32. (a) Concentración media de las muestras de semen puro normozoospermicas y no normozoospermicas. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la concentración de espermatozoides entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. **(b) Concentración media de las muestras de semen recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la concentración de espermatozoides entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

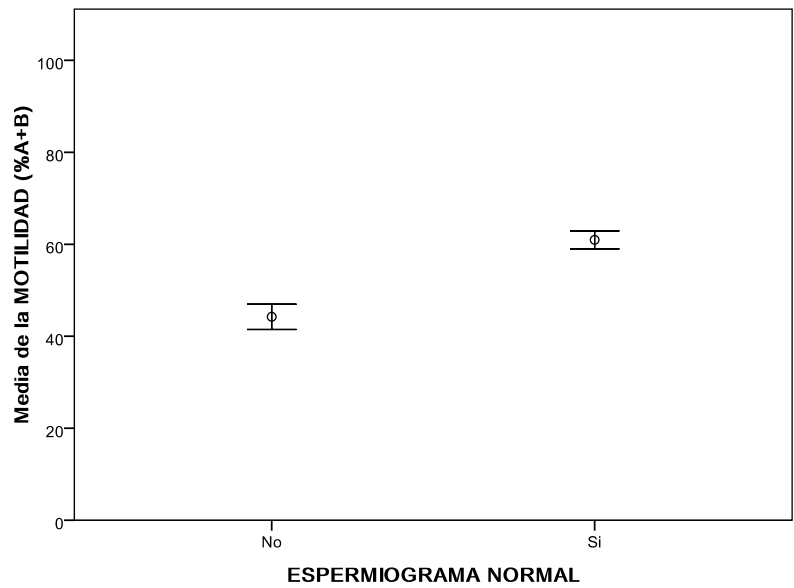
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

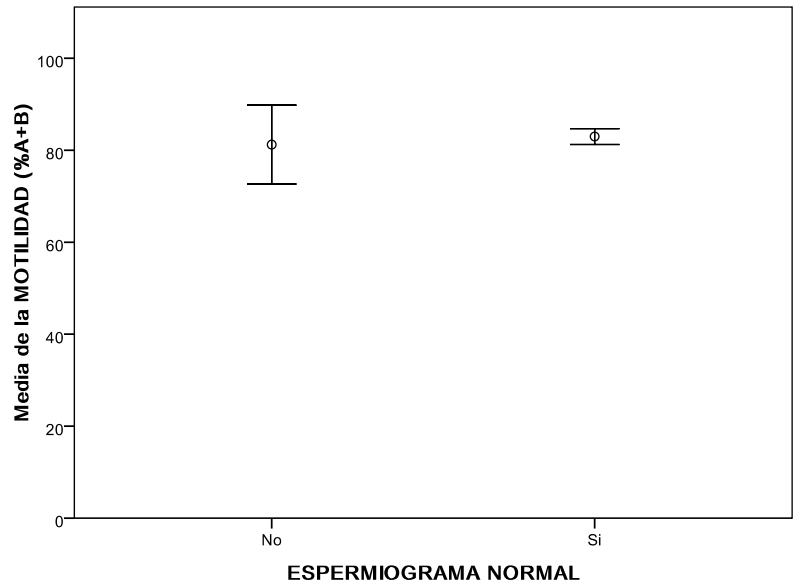
b

Figura 33. (a) Motilidad media (%A+B) de las muestras semen puro normozoospermicas y no normozoospermicas. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la motilidad entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. **(b) Motilidad media (%A+B) de las muestras de semen recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la motilidad entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

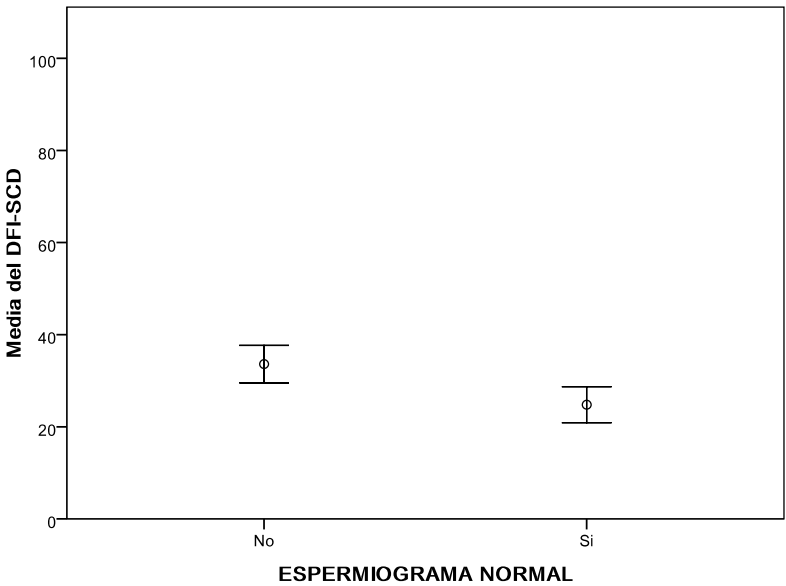
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

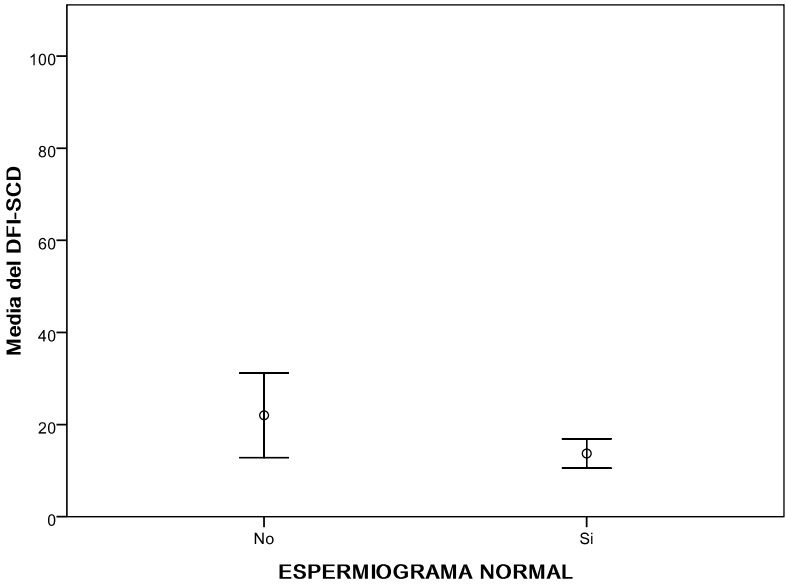
b

Figura 34. (a) Índice de fragmentación de ADN medio calculado mediante el test SCD (DFI-SCD) de las muestras de semen puro normozoospermicas y no normozoospermicas. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI-SCD entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. **(b) Índice de fragmentación de ADN medio calculado mediante el test SCD (DFI-SCD) de las muestras de semen recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI-SCD entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

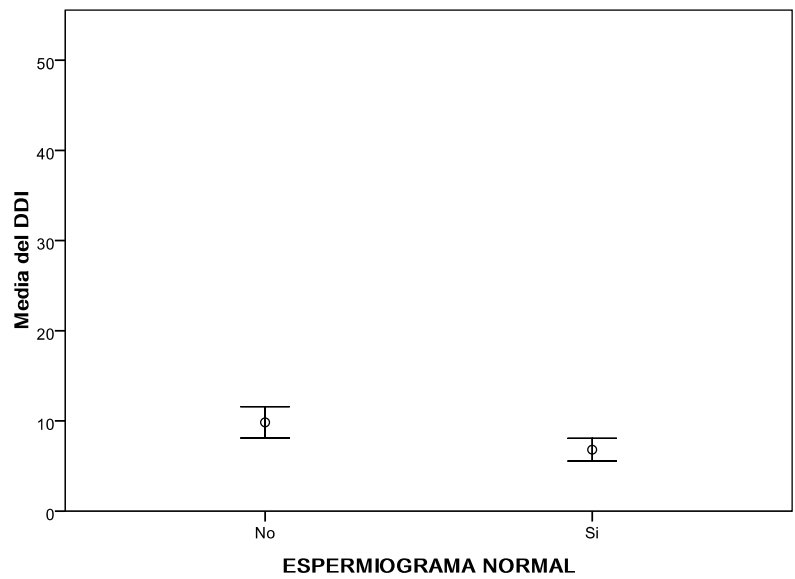
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

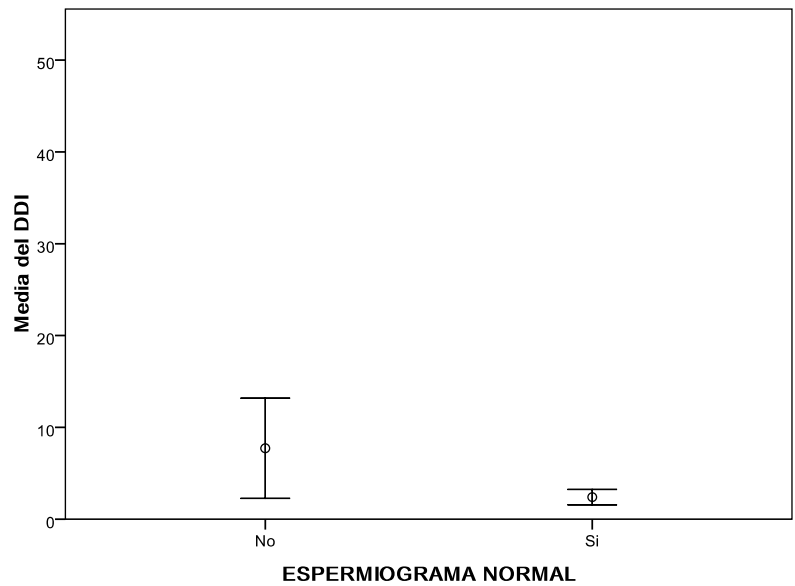
b

Figura 35. (a) Índice de degradación de ADN (DDI) medio calculado mediante el test SCD de las muestras de semen puro normozoospermicas y no normozoospermicas. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DDI entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. **(b) Índice de degradación de ADN (DDI) medio calculado mediante el test SCD de las muestras de semen recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DDI entre las muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

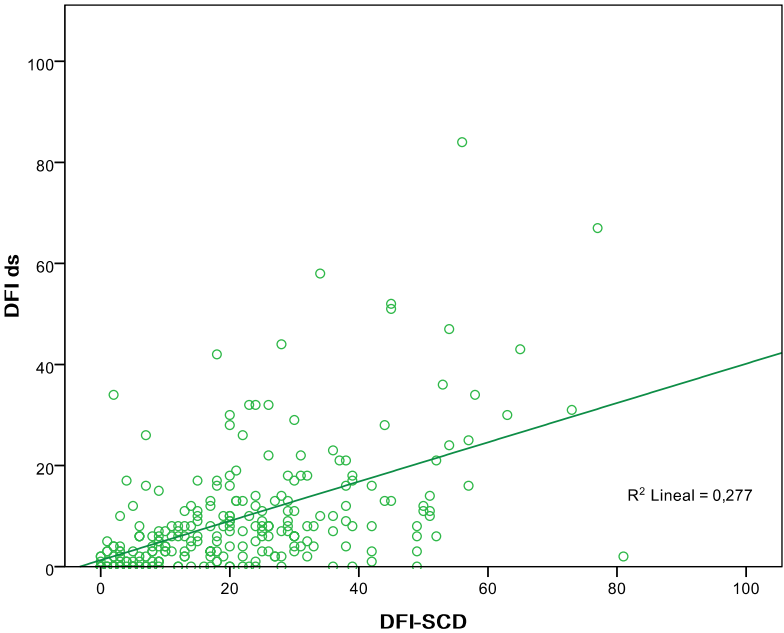
a



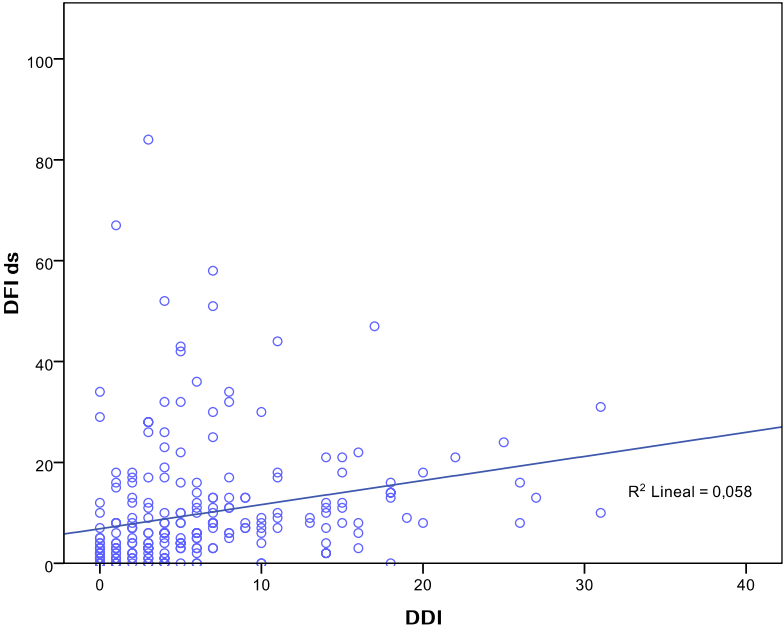
Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

b

Figura 36. Regresión lineal. (a) Regresión lineal del índice de fragmentación de ADN calculado mediante el test SCD (DFI- SCD) y el índice de fragmentación de ADN de cadena doble (DFI ds). (b) Regresión lineal del índice de degradación (ID) y el índice de fragmentación de ADN de cadena doble (DFI ds).

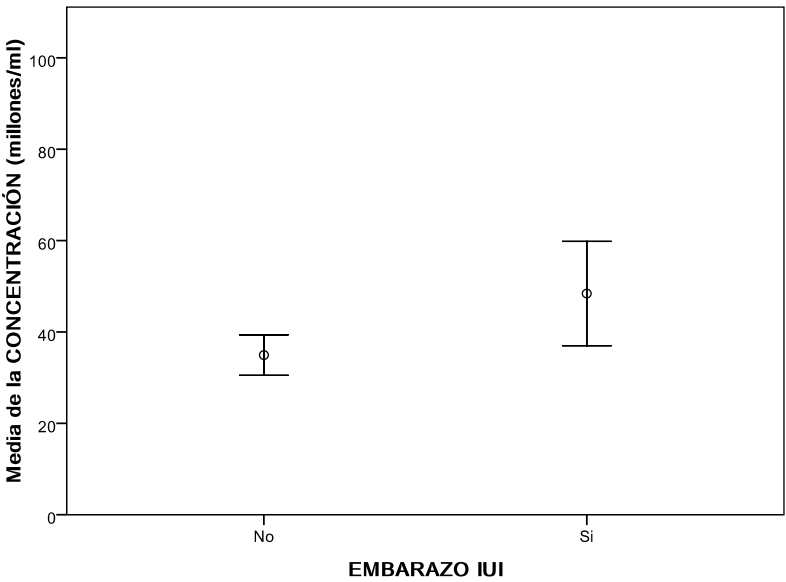


a



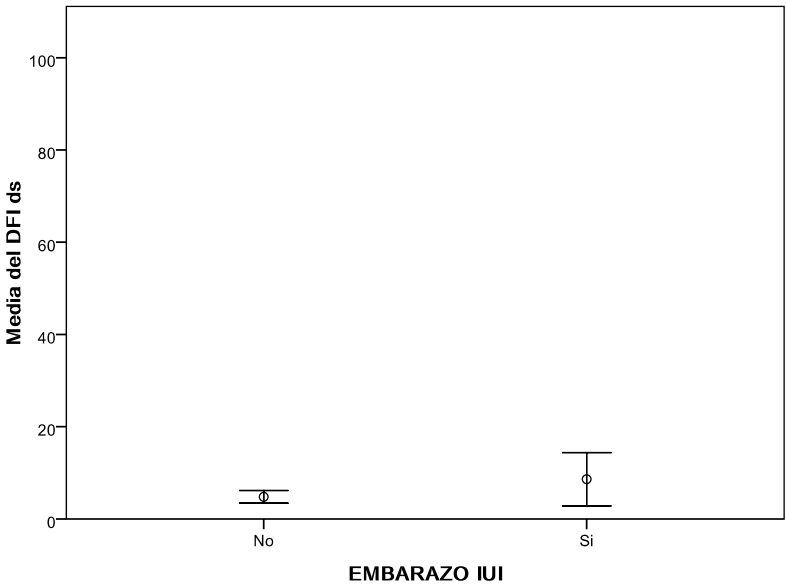
b

Figura 37. (a) Concentración media de las muestras de semen recuperadas utilizadas en inseminación artificial intrauterina (IUI) con éxito y fracaso de embarazo. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en la concentración de espermatozoides entre las muestras con resultado de éxito y fracaso de embarazo. **(b) Índice de fragmentación de ADN de cadena doble (DFI ds) medio calculado mediante el ensayo cometa en dos dimensiones (2D) de las muestras recuperadas utilizadas en inseminación artificial intrauterina (IUI) con éxito y fracaso de embarazo.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ds entre las muestras con éxito y fracaso de embarazo.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

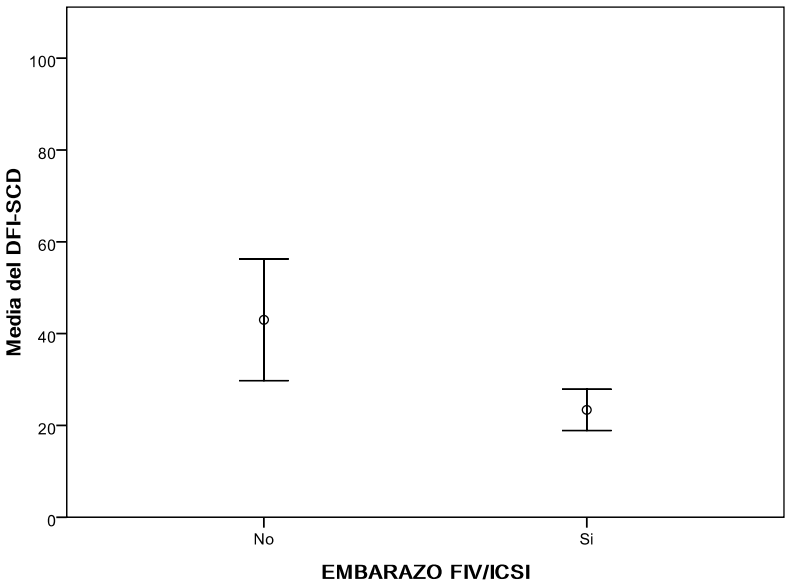
a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

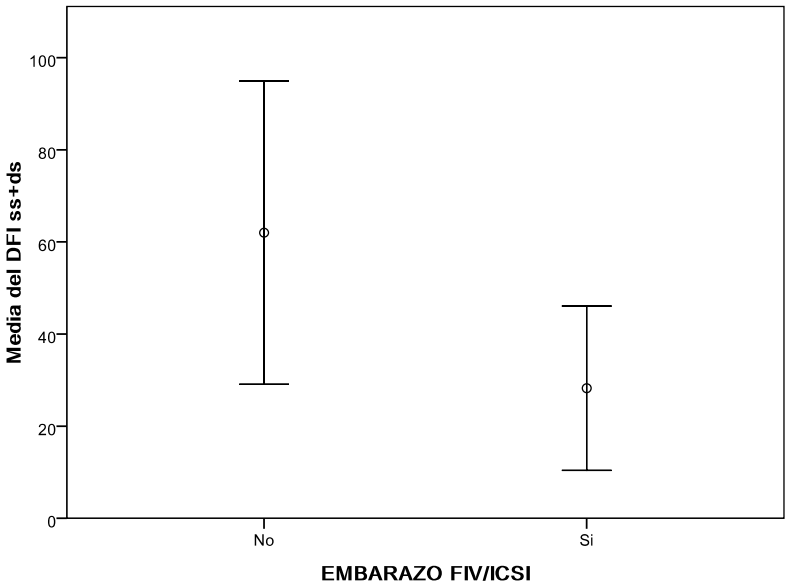
b

Figura 38. (a) Índice de fragmentación de ADN medio calculado mediante el test SCD (DFI-SCD) de las muestras de semen puro utilizadas en FIV/ICSI con éxito y fracaso de embarazo. Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI-SCD entre las muestras con éxito de embarazo en FIV/ICSI y las muestras con fracaso de embarazo en FIV/ICSI. **(b) Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla y doble (DFI ss+ds) medio calculado mediante el ensayo cometa en dos dimensiones (2D) de las muestras de semen recuperadas utilizadas en FIV/ICSI con éxito y fracaso de embarazo.** Se encontraron diferencias significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$) en el DFI ss+ds calculado entre las muestras con éxito de embarazo en FIV/ICSI y las muestras con fracaso de embarazo en FIV/ICSI.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

b

Figura 39. Espermatozoides de cerdo y humano procesadas con el protocolo del test SCD desarrollado para espermatozoides humanos. (a) Espermatozoides de cerdo teñidos con DAPI. **(d)** Espermatozoides humanos teñidos con DAPI. **(c)** Prueba DBD-FISH realizada sobre espermatozoides de cerdo usando una sonda de ADN genómico de cerdo. **(d)** Prueba DBD-FISH realizada sobre espermatozoides humanos usando una sonda de ADN genómico humano. La prueba DBD-FISH realizada para detectar la presencia de roturas de ADN demuestra que los espermatozoides sin halo o con halo pequeño tienen el ADN fragmentado en ambas especies.

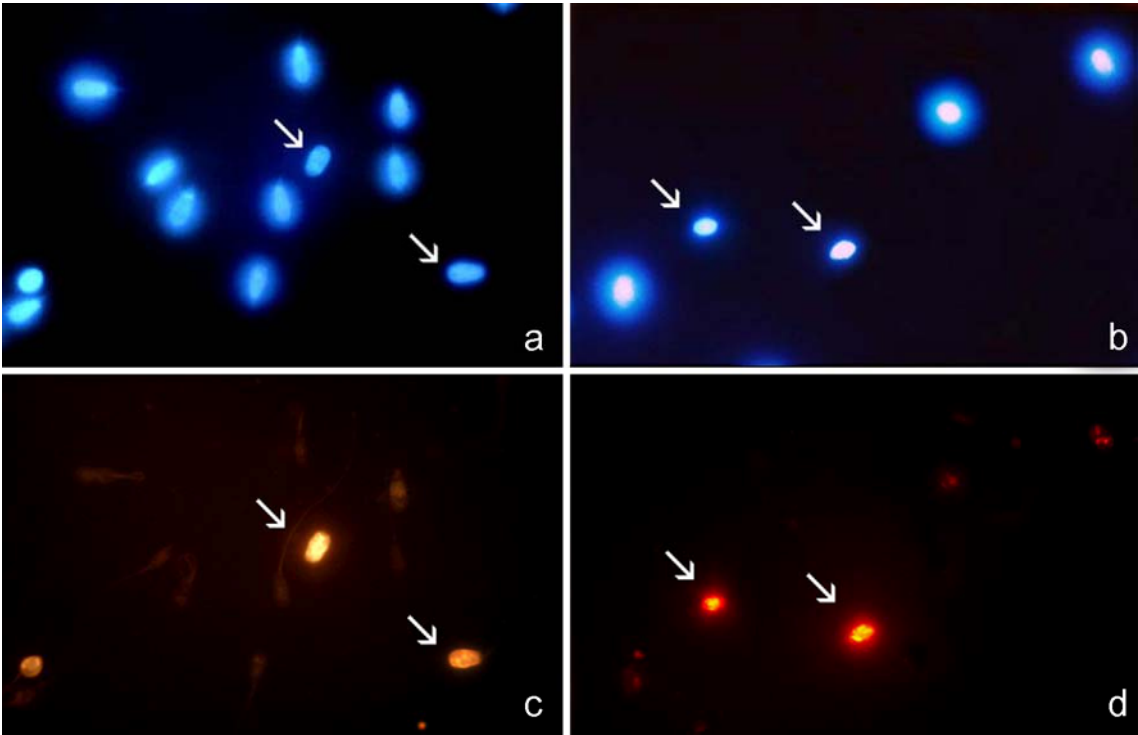


Figura 40. Test SCD modificado en espermatozoides de cerdo. Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde).

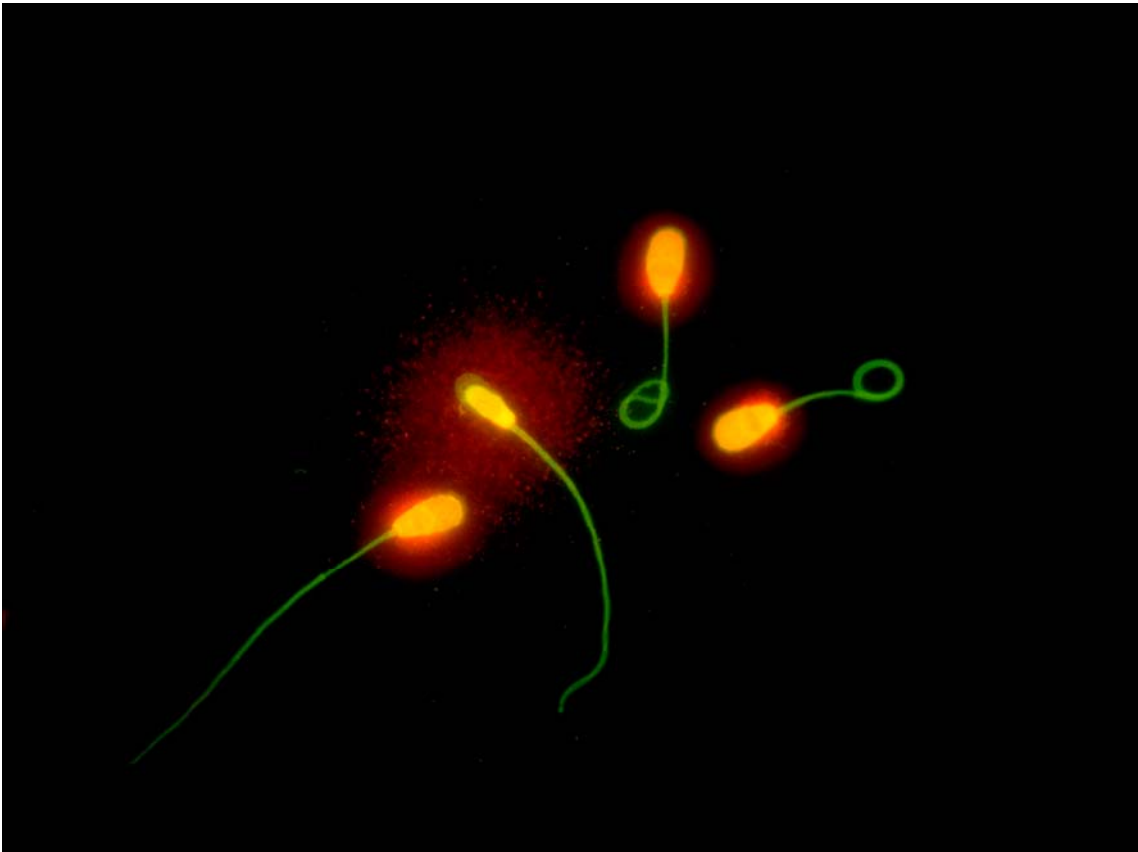


Figura 41. Espermatozoides de cerdo procesados con el protocolo del test SCD modificado. (a) Espermatozoides de cerdo teñidos con Wright. (b,c) Espermatozoides con el ADN intacto teñidos con Wright. (d) Espermatozoide con el ADN fragmentado teñido con Wright. (e) Prueba de *in situ* Nick Translation (ISNT) realizada sobre espermatozoides de cerdo previamente procesados con el test SCD. Este ensayo detecta la presencia de roturas de ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados (verde) usando la ADN polimerasa I. Los nucleoides están contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). Los nucleoides con halo grande de dispersión de la cromatina corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado. (f,g) Espermatozoides con el ADN intacto tras la ISNT. (h) Espermatozoide con el ADN fragmentado tras la ISNT.

Figura 42. Índice de fragmentación de ADN (DFI) en 10 individuos usando tres métodos diferentes de evaluación del daño de ADN (SCD, ISNT, DBD-FISH). No se encontraron diferencias significativas en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo de ISNT. Se encontraron diferencias significativas en el índice de fragmentación calculado mediante el test SCD y el ensayo DBD-FISH (ANOVA, $p > 0,05$).

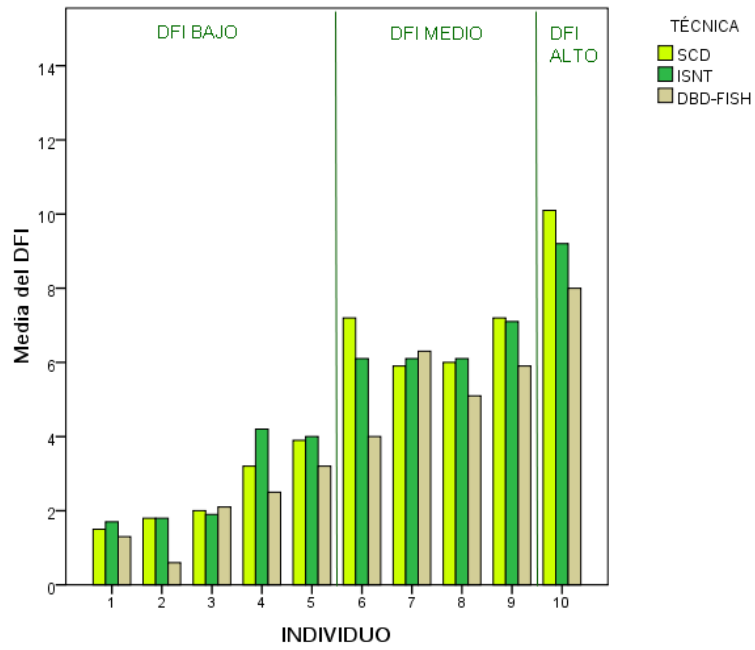
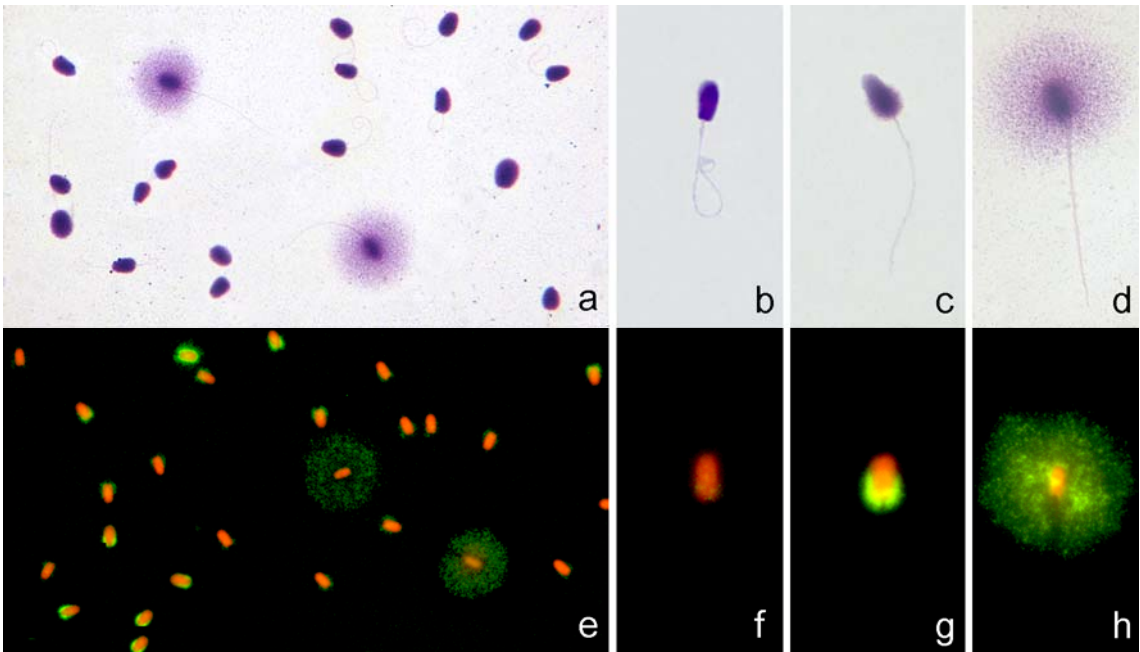


Figura 43. Análisis de imagen digital. Definición de las regiones del campo de visión que se desean medir: 1, espermatozoide con el ADN intacto; 2, espermatozoide con el ADN fragmentado. **(a)** Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio. **(b)** Los mismos espermatozoides detectados con el programa informático *Leica Q Win Pro*.

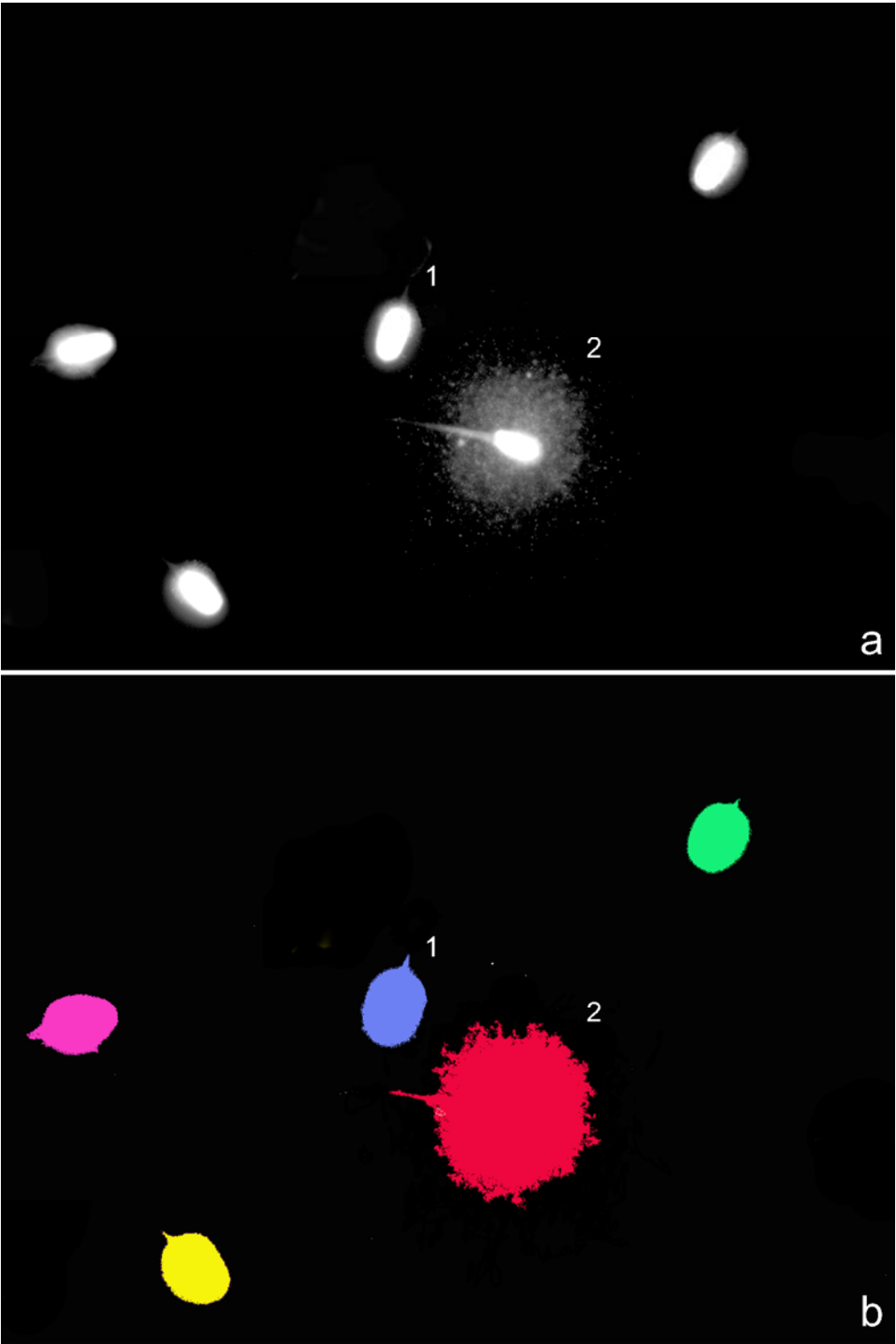
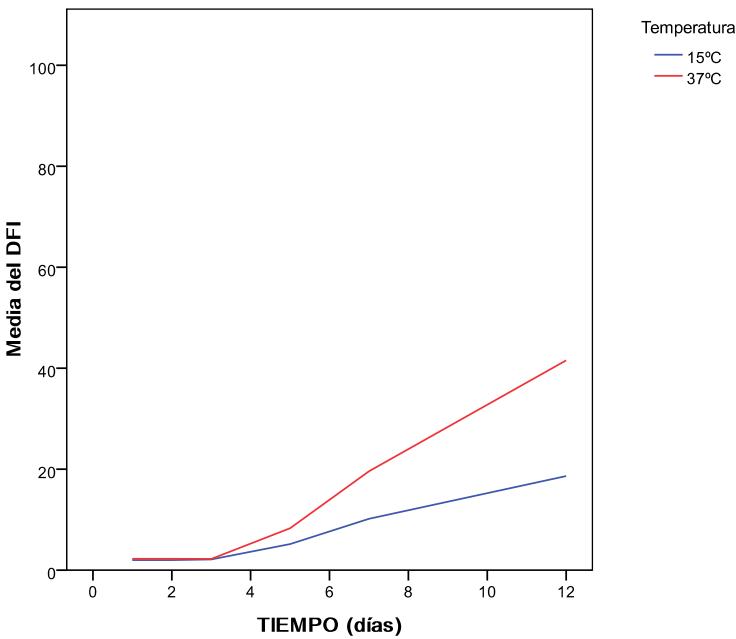
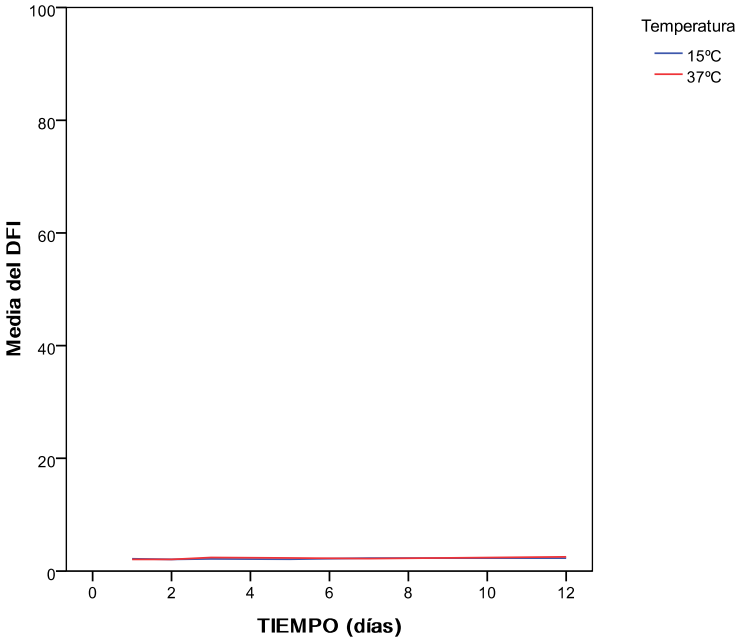


Figura 44. Efecto de la temperatura y del uso de diluyentes sobre la integridad del ADN. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato a 15 y a 37°C. Las diferencias en el DFI entre 15 y 37°C son significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$). **(b)** Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en Acromax a 15 y a 37°C. Las diferencias en el DFI entre 15 y 37°C no son significativas (U Mann Whitney, $p > 0,05$).

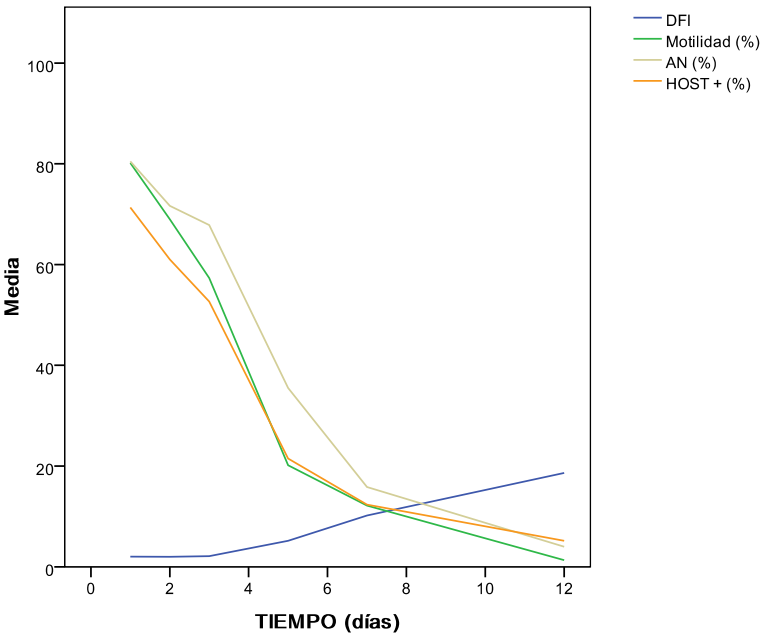


a

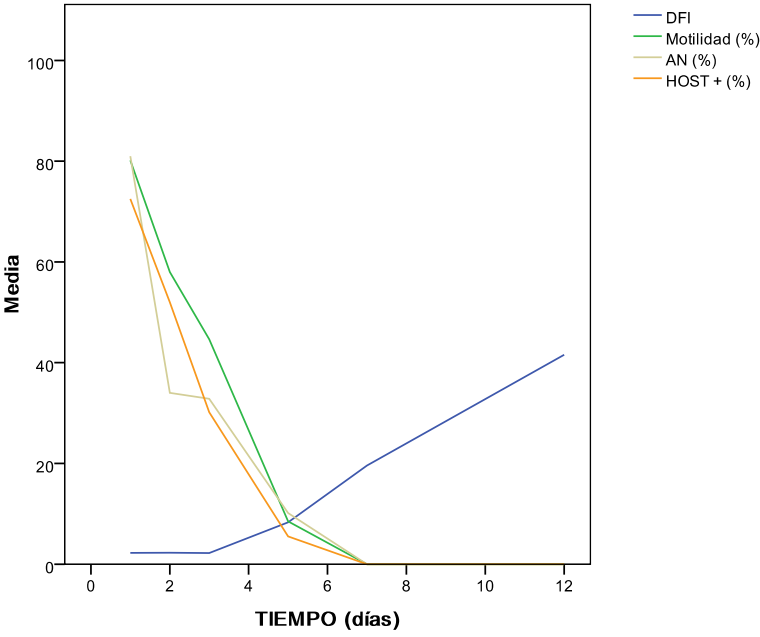


b

Figura 45. Efecto de la temperatura y del uso de diluyentes sobre la calidad seminal. **(a)** Evolución de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación, motilidad, integridad acrosómica y de la membrana plasmática (HOST +) medios analizados en 6 muestras de semen de cerdo incubadas durante 12 días en tampón fosfato a 15°C. **(b)** Evolución de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación, motilidad, integridad acrosómica y de la membrana plasmática (HOST +) medios analizados en 6 muestras de semen de cerdo incubadas durante 12 días en tampón fosfato a 37°C.

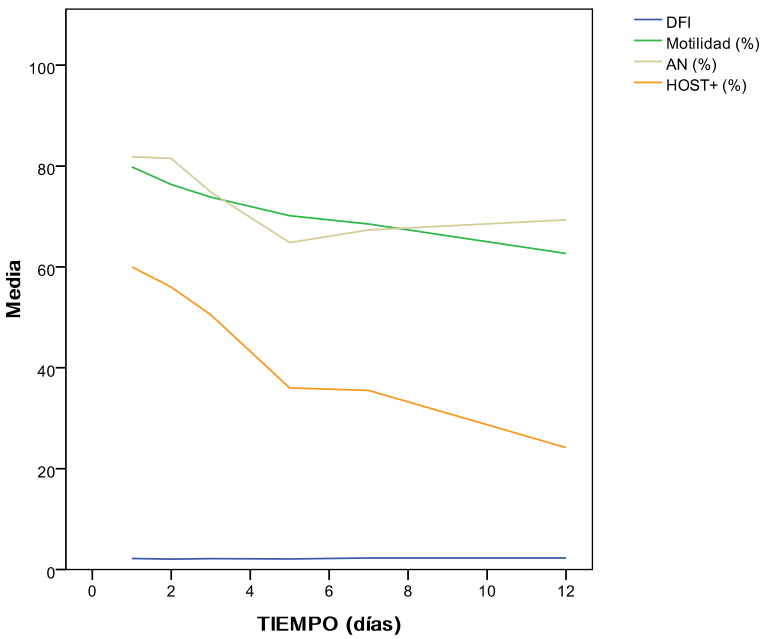


a

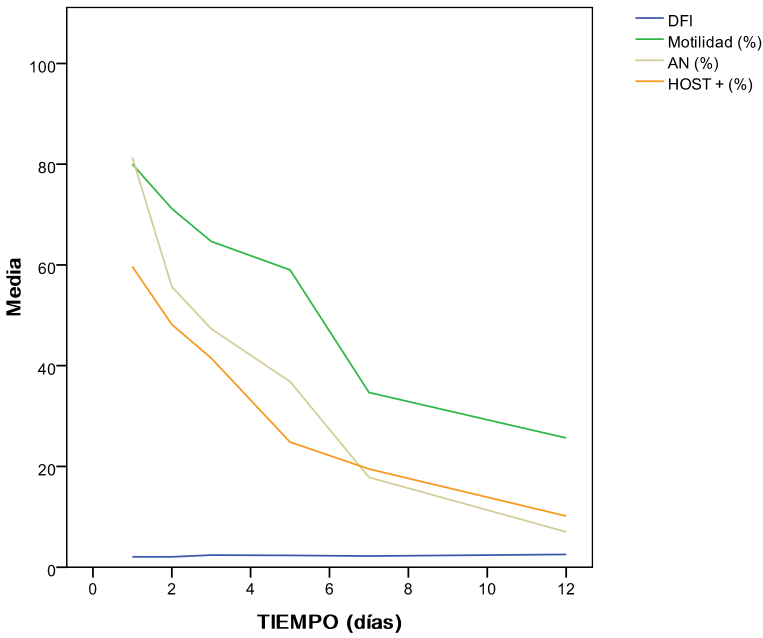


b

Figura 46. Efecto de la temperatura y del uso de diluyentes sobre la calidad seminal. (a) Evolución de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación, motilidad, integridad acrosómica y de la membrana plasmática (HOST +) medios analizados en 6 muestras de semen de cerdo incubadas durante 12 días en Acromax a 15° C. (b) Evolución de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación, motilidad, integridad acrosómica y de la membrana plasmática (HOST +) medios analizados en 6 muestras de semen de cerdo incubadas durante 12 días en Acromax a 37° C

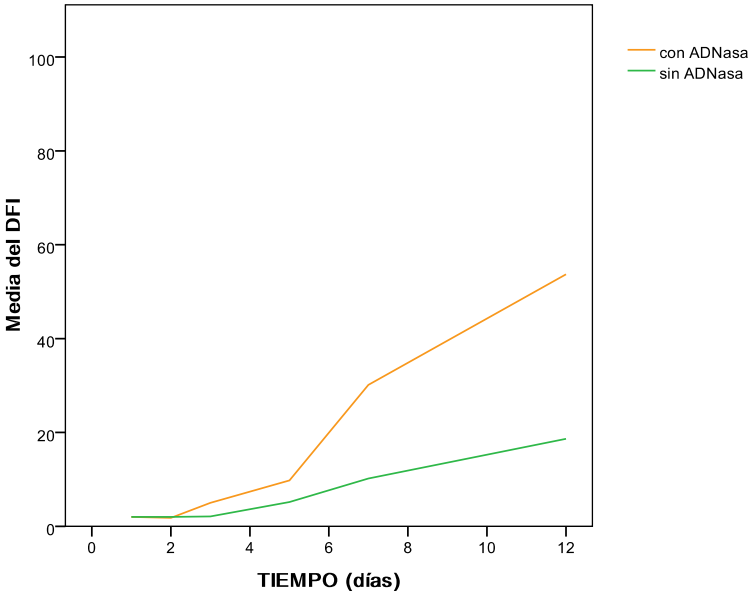


a

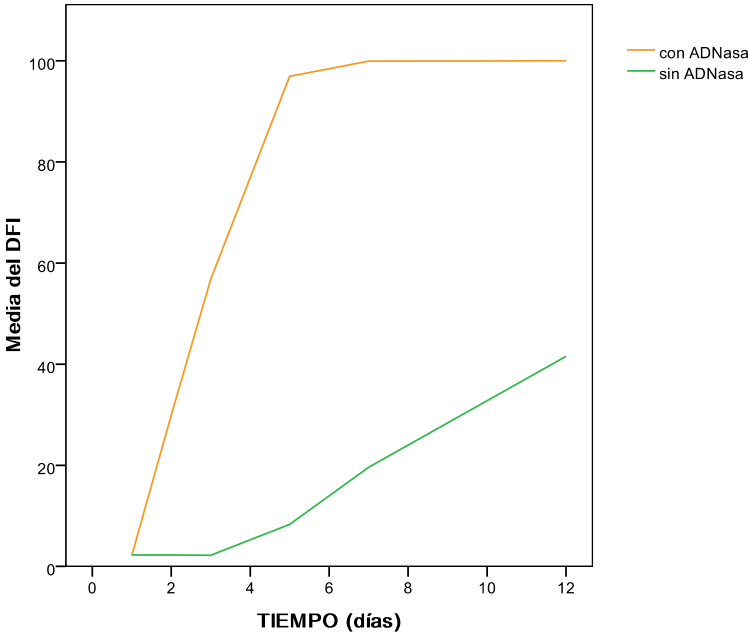


b

Figura 47. Efecto de la adición de ADNasa sobre la integridad del ADN. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato con y sin ADNasa a 15°C. Las diferencias en el DFI son significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$). (b) Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato con y sin ADNasa a 37°C. Las diferencias en el DFI son significativas (U Mann Whitney, $p < 0,05$).

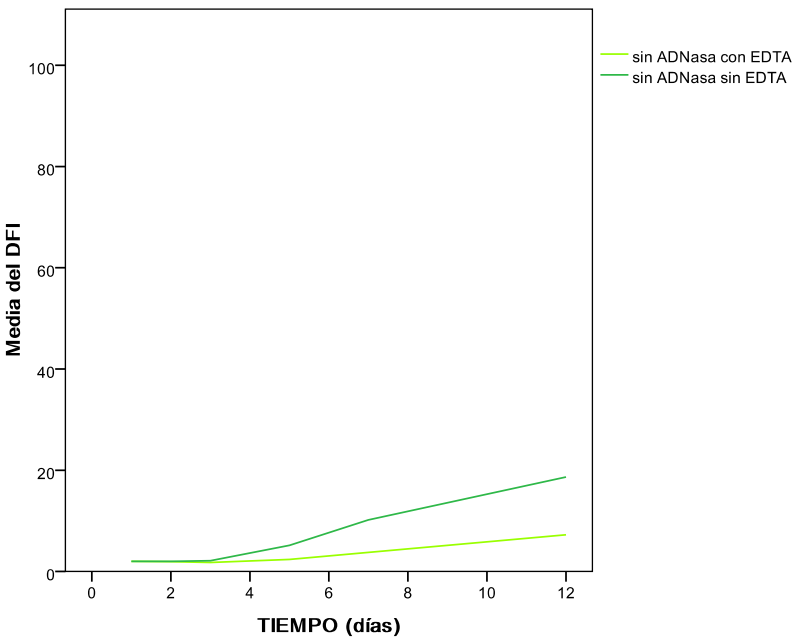


a

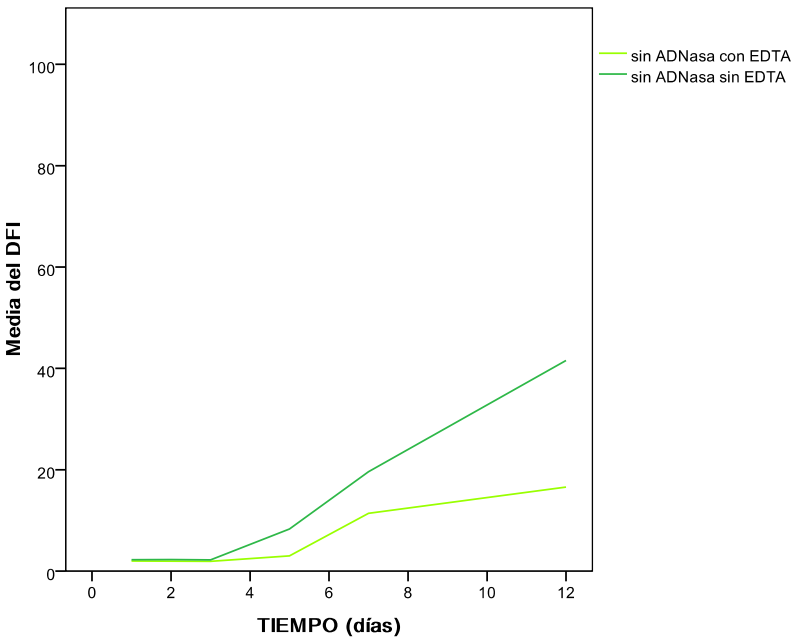


b

Figura 48. Efecto de la adición de EDTA sobre la integridad del ADN. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato sin ADNasa con y sin EDTA a 15°C. Las diferencias son significativas (Mann Whitney, $p < 0,05$). **(b)** Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato sin ADNasa con y sin EDTA a 37 °C. Las diferencias en el DFI no son significativas (Mann Whitney, $p > 0,05$).

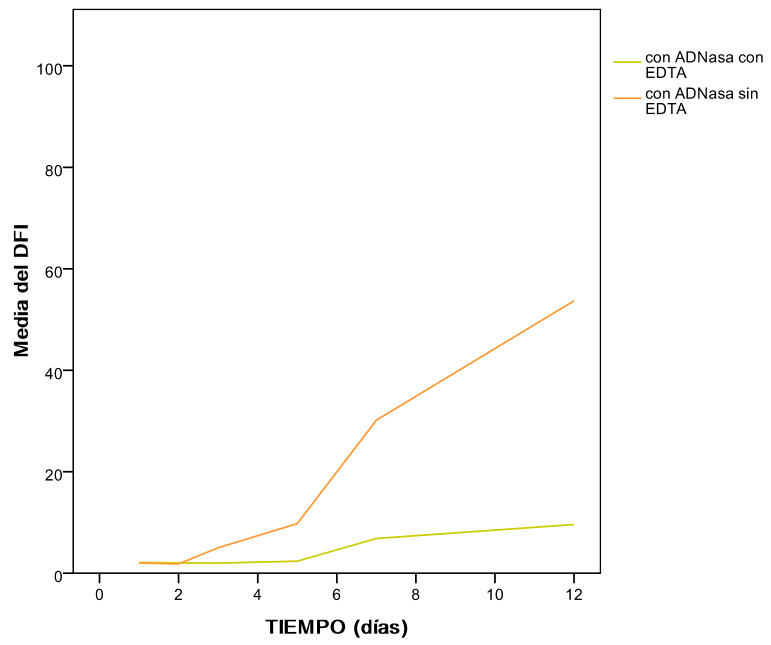


a

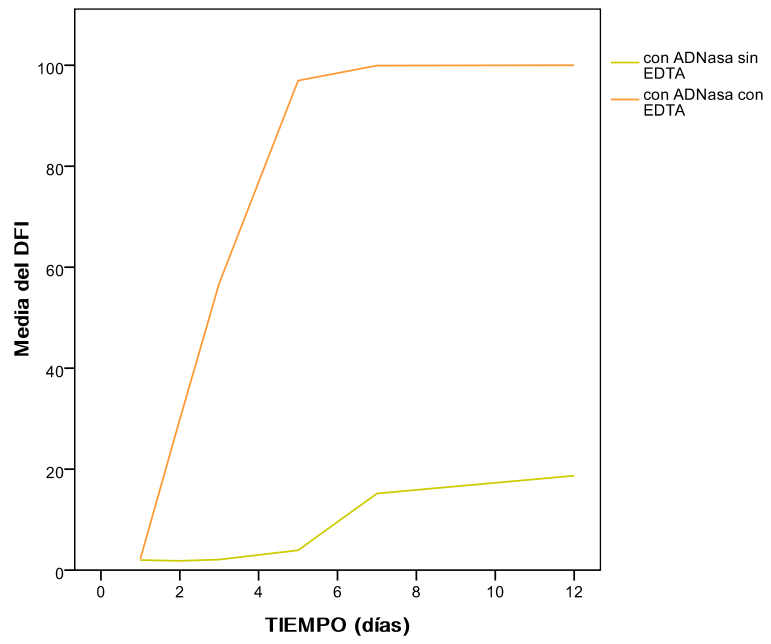


b

Figura 49. Efecto de la adición de EDTA y ADNasa sobre la integridad del ADN. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato con ADNasa con y sin EDTA a 15°C. Las diferencias en el DFI son significativas (Mann Whitney, $p < 0,05$). **(b)** Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio en los 12 días de incubación en tampón fosfato con ADNasa con y sin EDTA a 37°C. Las diferencias en el DFI son significativas (Mann Whitney, $p < 0,05$).



a



b

Figura 50. Test SCD modificado en espermatozoides de toro. (a) Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de toro procesada con el test SCD teñidos con Wright. **(b)** Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de toro procesada con el test SCD teñidos con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde).

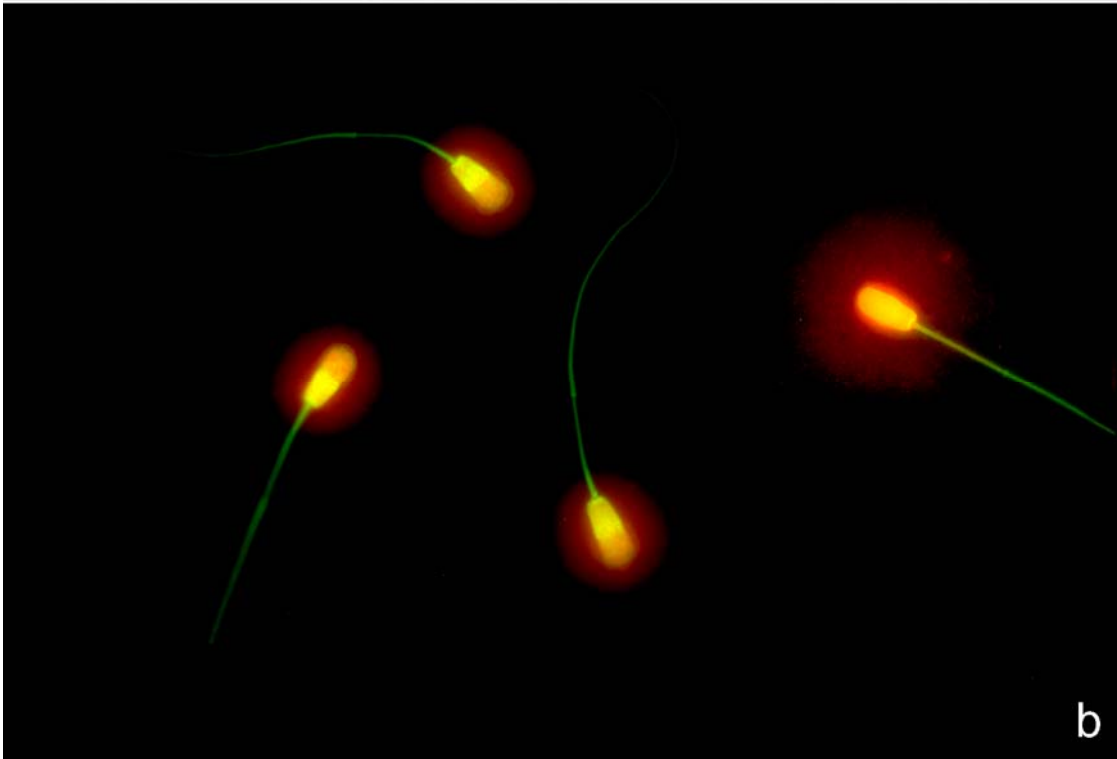
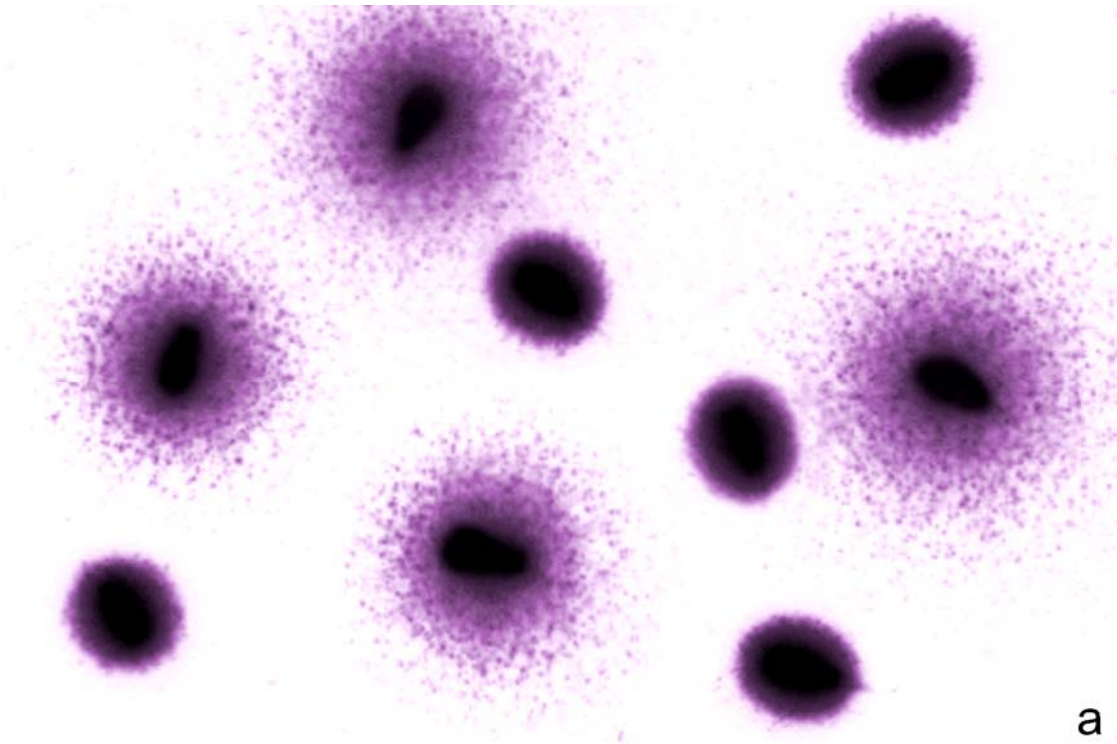


Figura 51. *In Situ* Nick Translation (ISNT) realizada sobre espermatozoides de toro previamente procesados con el test SCD. (a) Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde). (b) Prueba de ISNT que detecta la presencia de roturas mediante la incorporación de nucleótidos marcados (verde) usando la ADN polimerasa I. Los nucleoides están contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). Los nucleoides con halo grande de dispersión de la cromatina corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado.

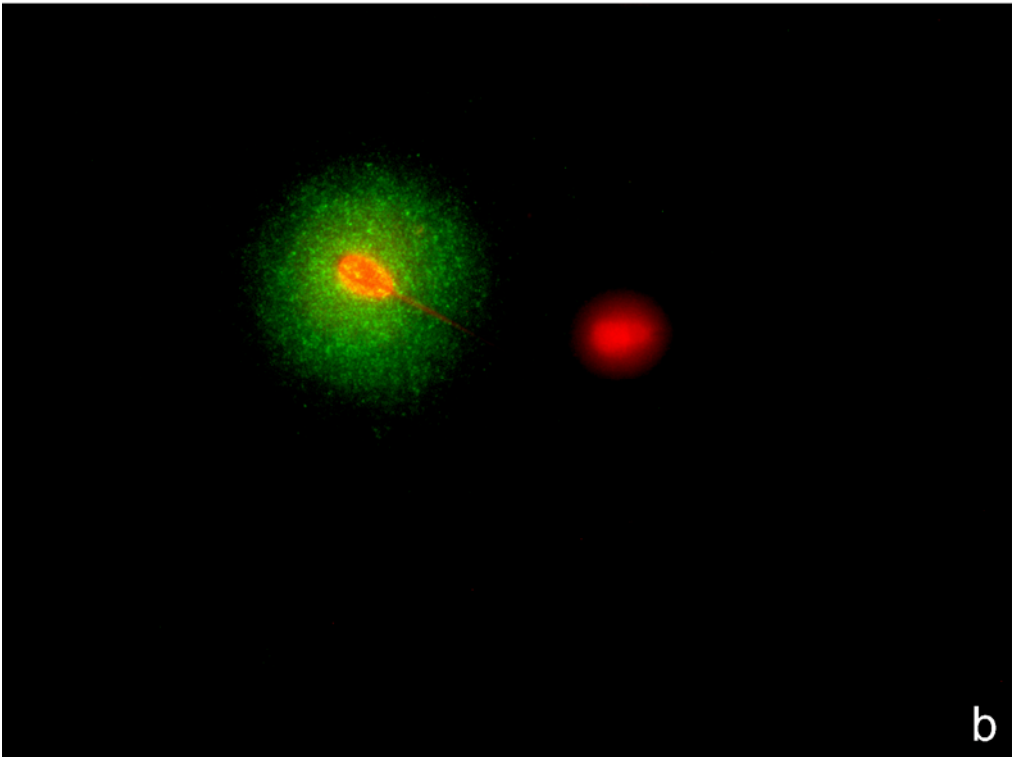
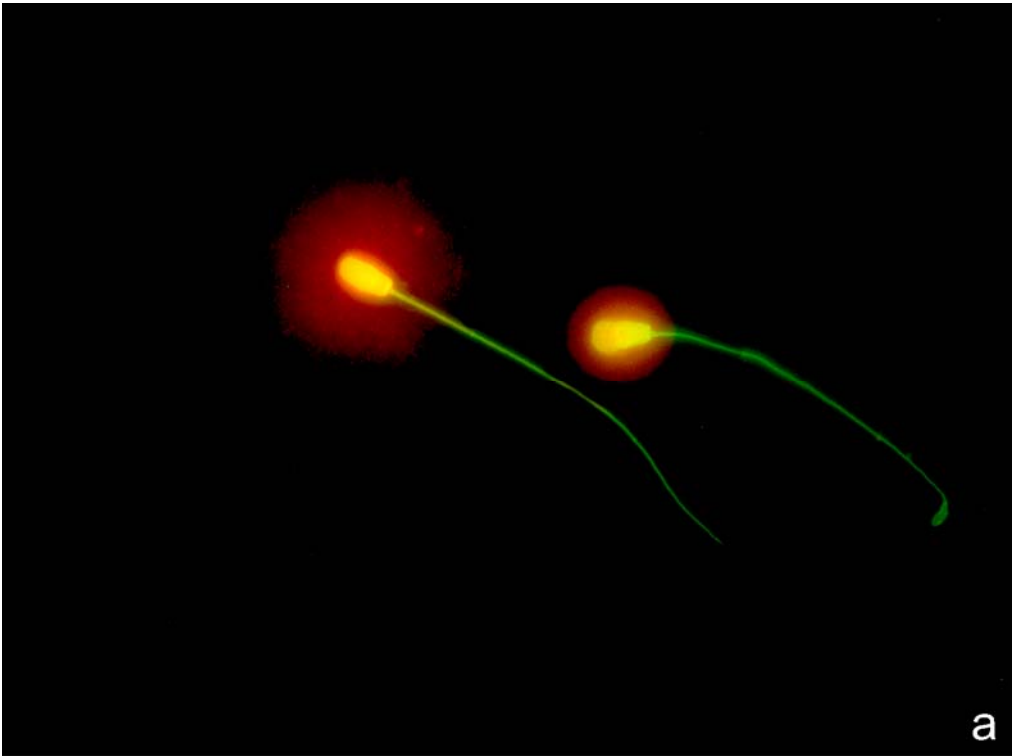
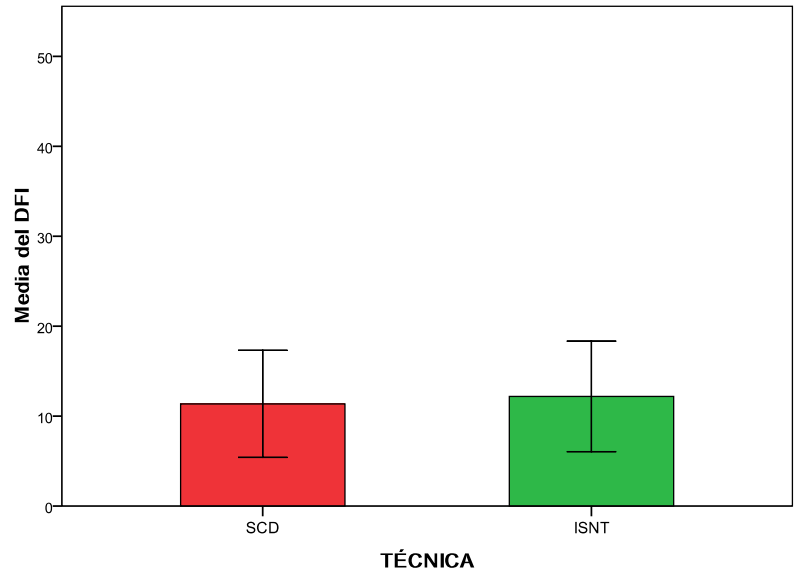


Figura 52. Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio de 17 muestras de semen pertenecientes a 17 individuos analizados mediante el test SCD y el ensayo ISNT. Se contaron 500 espermatozoides por muestra y técnica. No se encontraron diferencias significativas en los DFI's determinados por ambas técnicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 53. Anomalías morfológicas encontradas en espermatozoides de toro con el ADN fragmentado. (a) Normal. **(b)** Cola en látigo. **(c)** Cabeza redonda. **(d)** Cola enrollada al final. **(e)** Cola truncada. **(f)** Cola truncada en el cuello. **(g)** “Dag defect”, alteración de la pieza intermedia. **(h)** Cola enrollada. **(i)** Cabeza suelta. **(j)** Cabeza pequeña anormal. **(k)** Cola corta, **(e)** Forma doble.

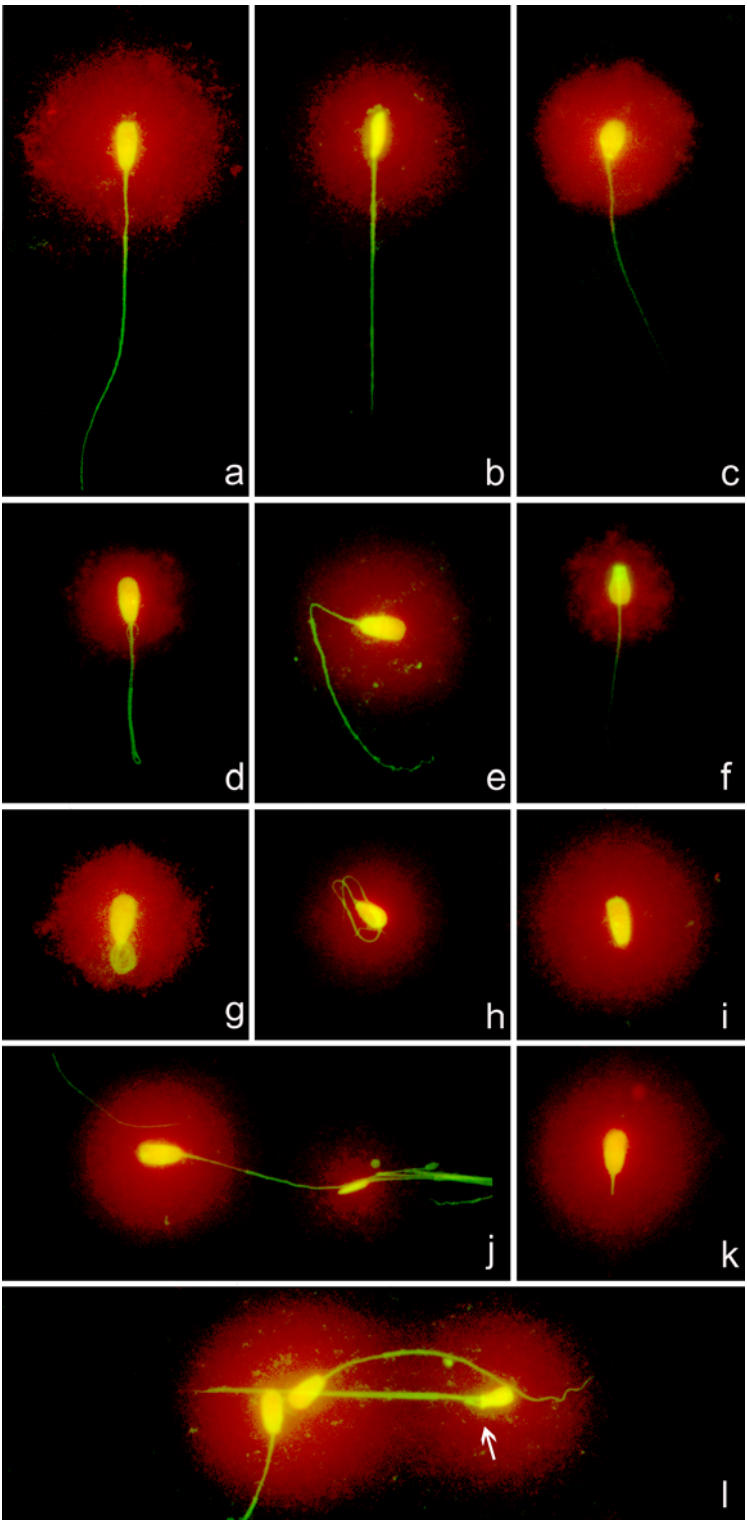


Figura 54. Anomalías morfológicas encontradas en espermatozoides de toro con el ADN intacto. (a) Normal. (b) Cola en látigo. (c) Cabeza redonda. (d) Cola enrollada al final. (e) Cola torcida. (f) Cola rota. (g) "Dag defect" o defecto de la pieza intermedia. (h) Cabeza gigante. (i) Cabeza suelta. (j) Cabeza pequeña anormal.

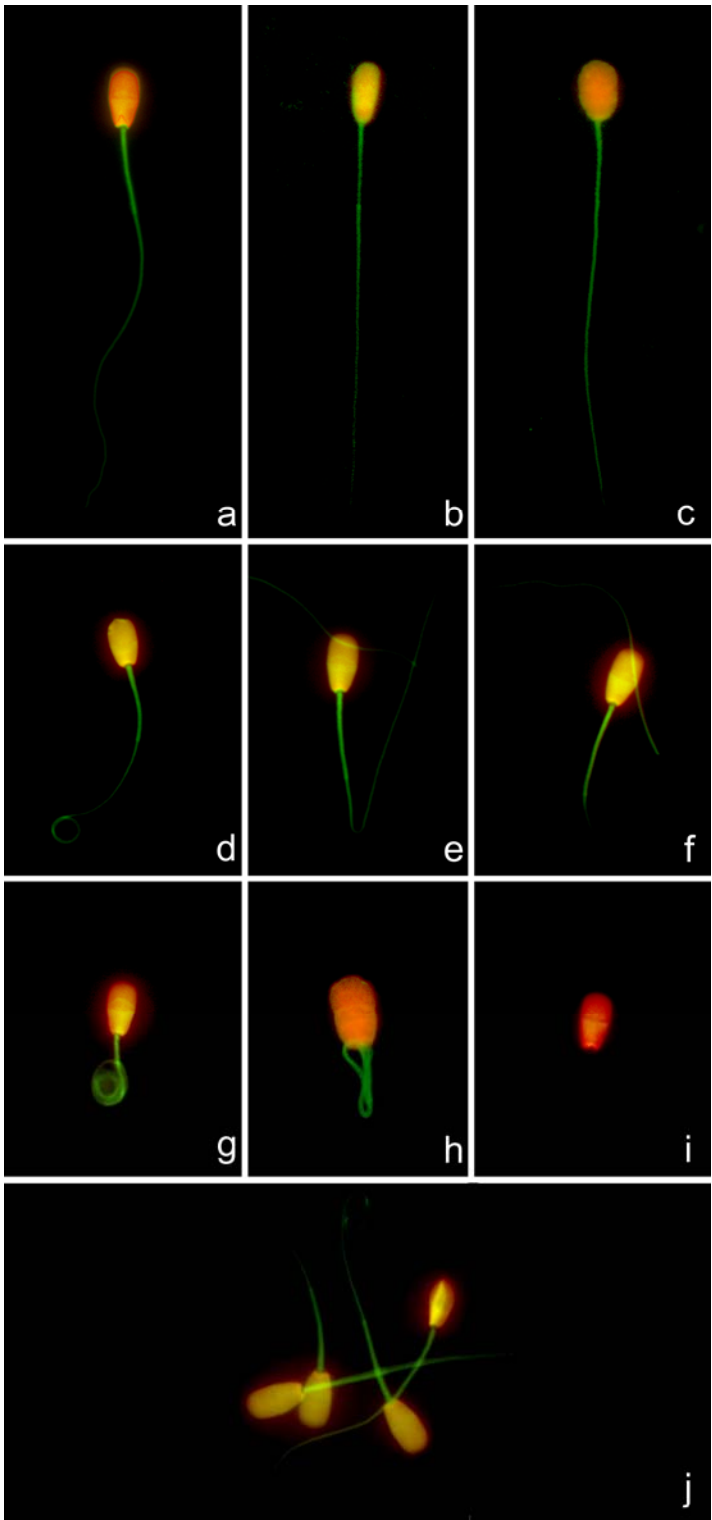
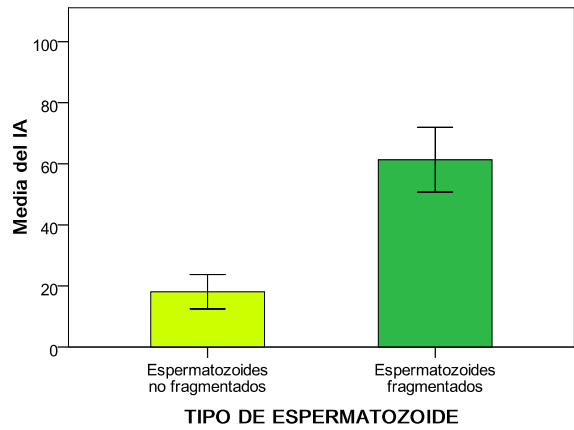
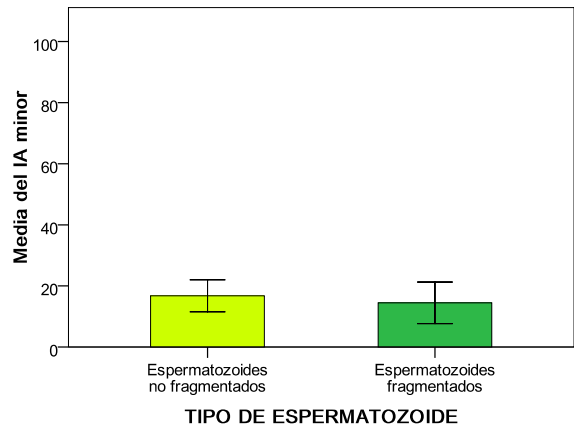


Figura 55. Índices de anomalías en espermatozoides con el ADN fragmentado e intacto. (a) Índice de anomalías morfológicas (IA) de los espermatozoides con el ADN fragmentado y de los espermatozoides con el ADN intacto. El IA de los espermatozoides con el ADN fragmentado es significativamente superior al IA de los espermatozoides con el ADN fragmentado (ANOVA, $p < 0.05$). (b) Índice de anomalías morfológicas *minor* (IA minor) de los espermatozoides con el ADN fragmentado y de los espermatozoides con el ADN intacto. No existen diferencias significativas en el IA minor entre los espermatozoides con el ADN fragmentado y los espermatozoides con el ADN intacto (c) Índice de anomalías morfológicas *major* (IA major) de los espermatozoides con el ADN fragmentado y de los espermatozoides con el ADN intacto. El IA major de los espermatozoides con el ADN fragmentado es significativamente superior al IA major de los espermatozoides con el ADN fragmentado (ANOVA, $p < 0.05$).



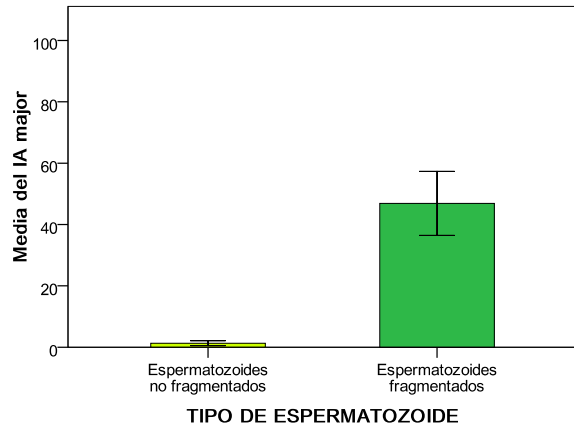
Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

a



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

b



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

c

Figura 56. Test SCD modificado en espermatozoides de ratón. (a) Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de ratón procesada con el test SCD teñidos con Sybr green en el microscopio de fluorescencia. **(b)** Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de ratón procesada con el test SCD teñidos con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde) en el microscopio de fluorescencia.

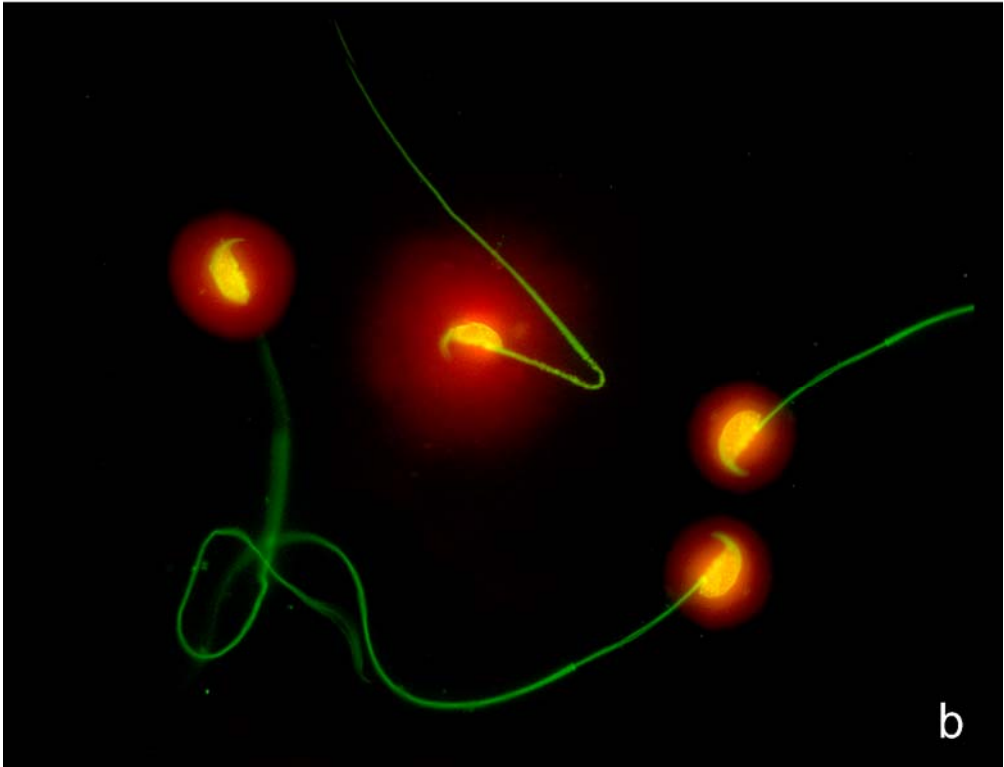
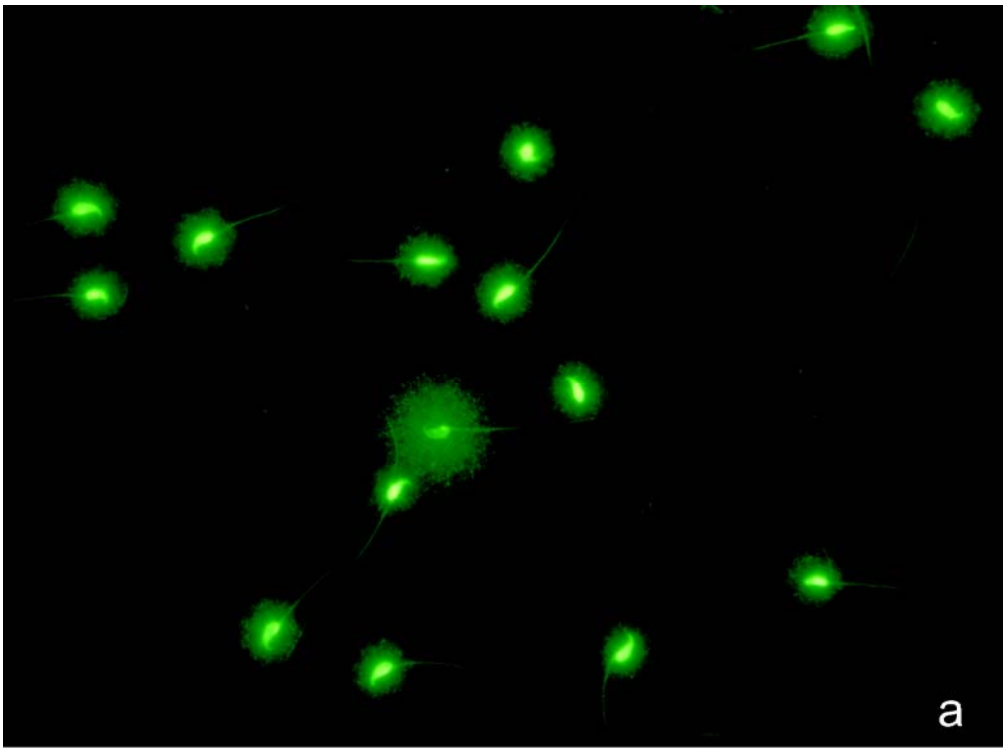


Figura 57. *In Situ* Nick Translation realizada sobre espermatozoides de ratón previamente procesados con el test SCD. (a) Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio. **(b)** Prueba de ISNT que detecta la presencia de roturas mediante la incorporación de nucleótidos marcados (verde) usando la ADN polimerasa I. Los nucleoides están contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). Los nucleoides con halo grande de dispersión de la cromatina corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado.

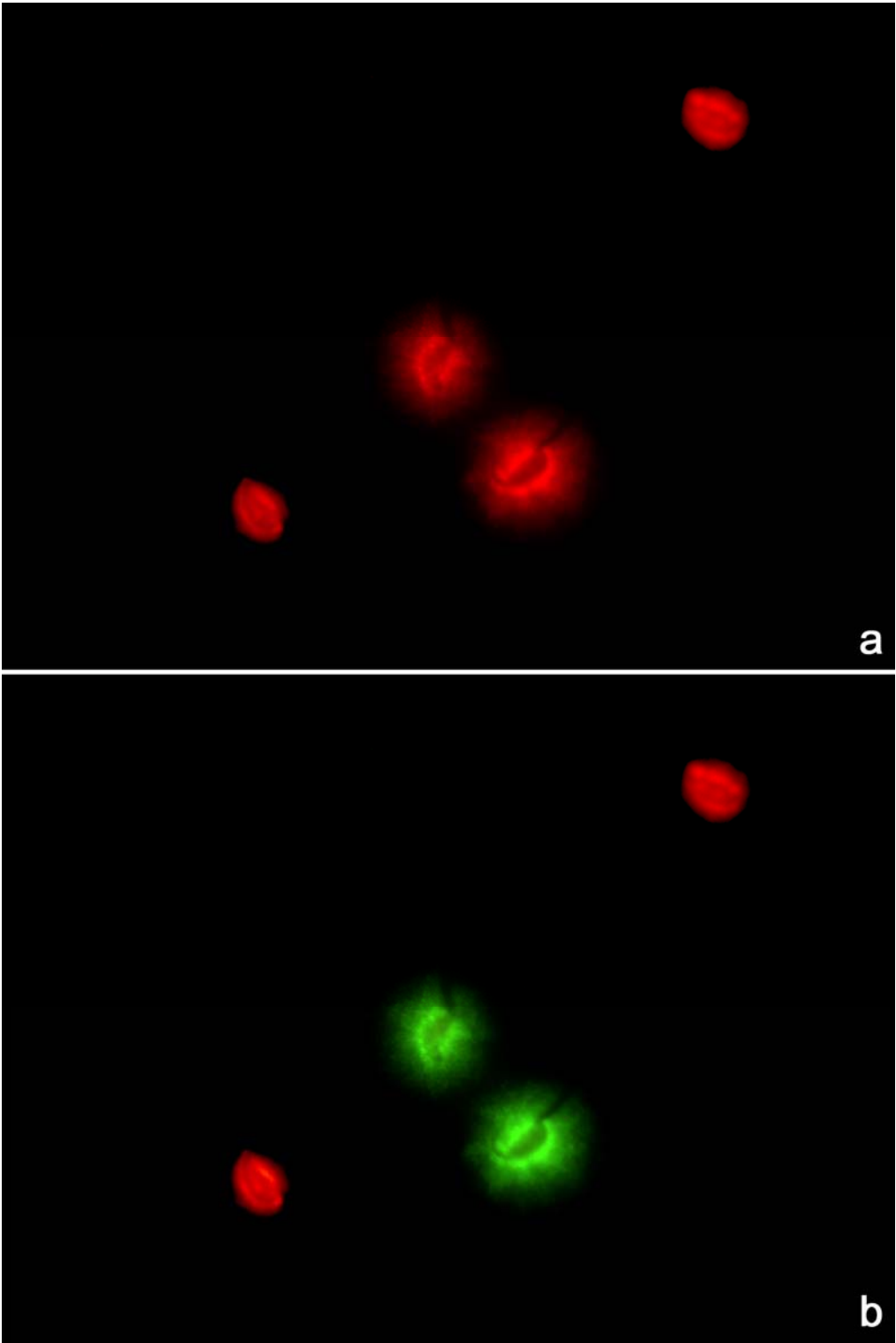
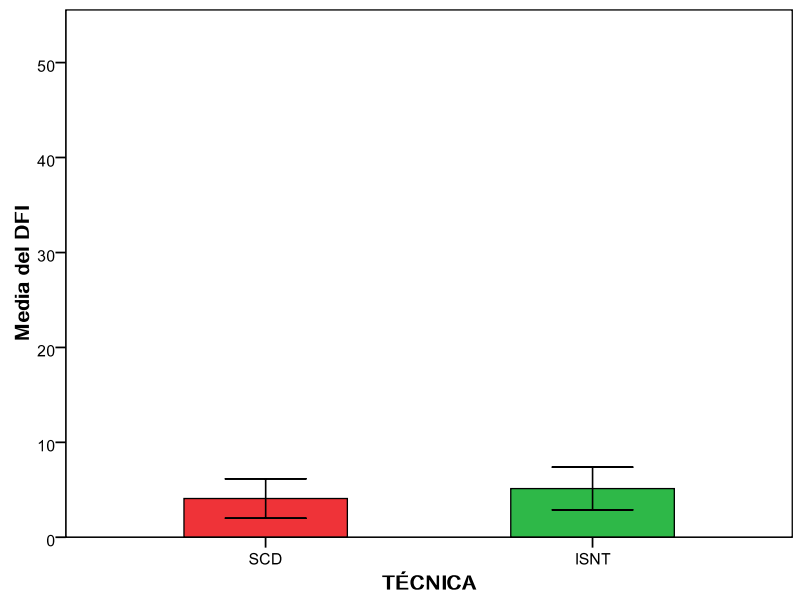
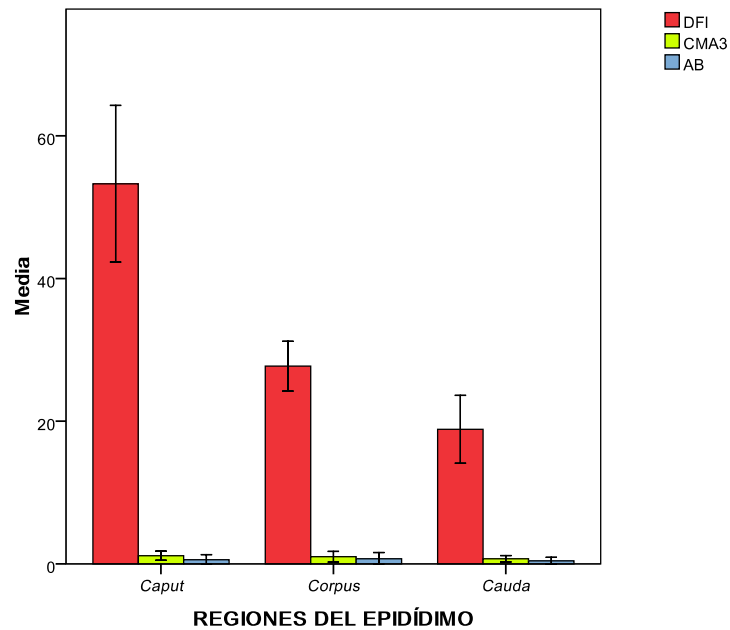


Figura 58. Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio de 20 muestras de semen de 20 individuos analizados mediante el test SCD y el ensayo ISNT. Se contaron 500 espermatozoides por muestra y método. No se encontraron diferencias significativas en los DFIs determinados por ambas técnicas.

Figura 59. Fragmentación y maduración en las tres regiones del epidídimo. (a) Índice de fragmentación de ADN (DFI) en cada una de las tres regiones del epidídimo. La frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en la región *caput* es significativamente superior a la de los espermatozoides de las regiones *corpus* y *cauda* (ANOVA y corrección de Bonferroni, $p < 0.05$). (b) Índice de maduración (% espermatozoides CMA3+) en cada una de las tres regiones del epidídimo. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de espermatozoides maduros en las tres regiones del epidídimo analizadas. (c) Índice de maduración (% de espermatozoides AB+) en cada una de las tres regiones del epidídimo. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de espermatozoides maduros en las tres regiones del epidídimo analizadas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 60. Test SCD modificado en espermatozoides de caballo. (a) Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de caballo procesada con el test SCD teñidos con Wright. **(b)** Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de caballo sometida al test SCD teñidos con Sybr green (verde) y eosina (azul).

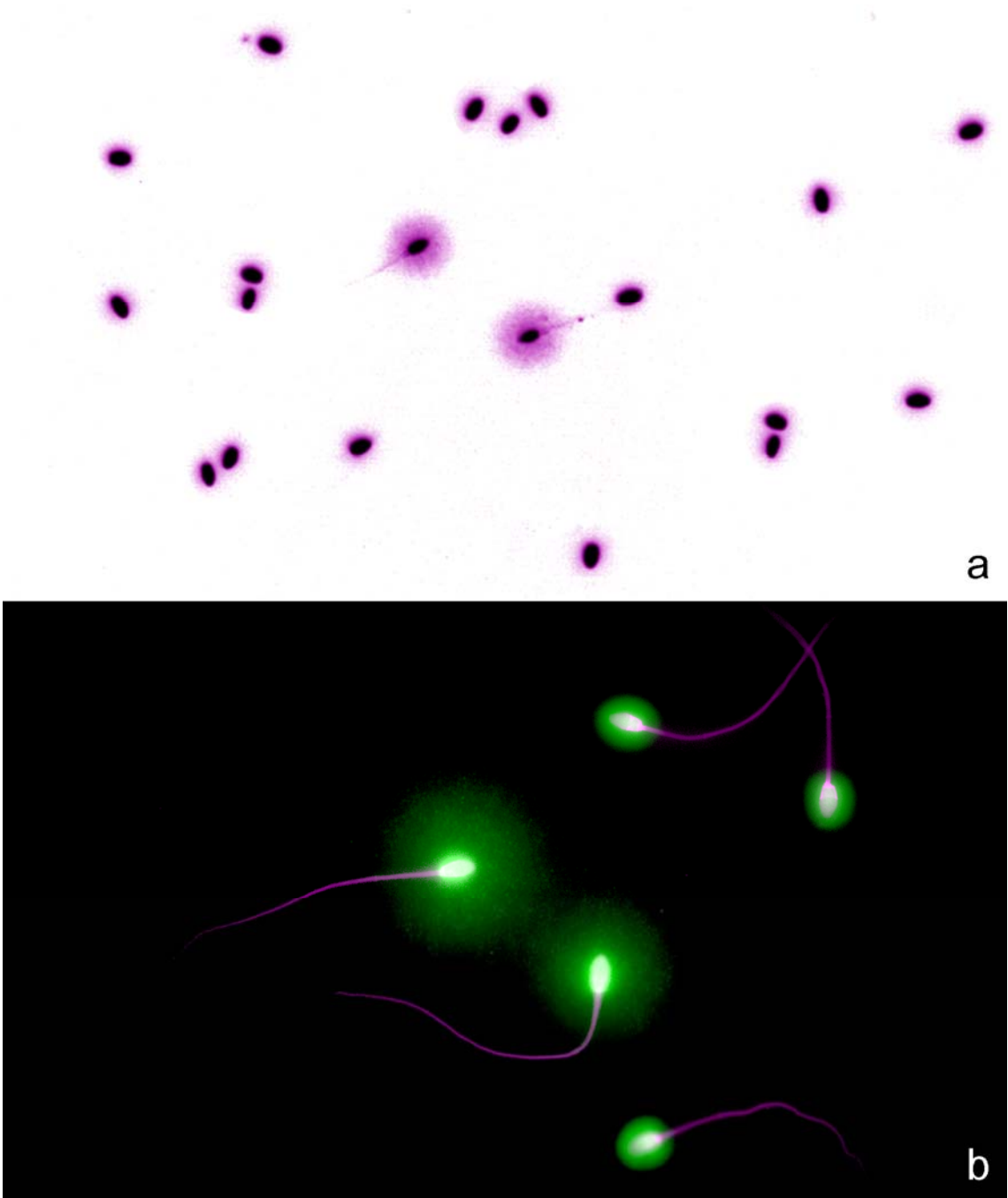


Figura 61. *In Situ* Nick Translation (ISNT) realizada sobre espermatozoides de caballo previamente procesados con el test SCD. (a) Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio. **(b)** Prueba de ISNT que detecta la presencia de roturas mediante la incorporación de nucleótidos marcados (verde) usando la ADN polimerasa I. Los nucleoides están contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). Los nucleoides con halo grande de dispersión de la cromatina corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado.

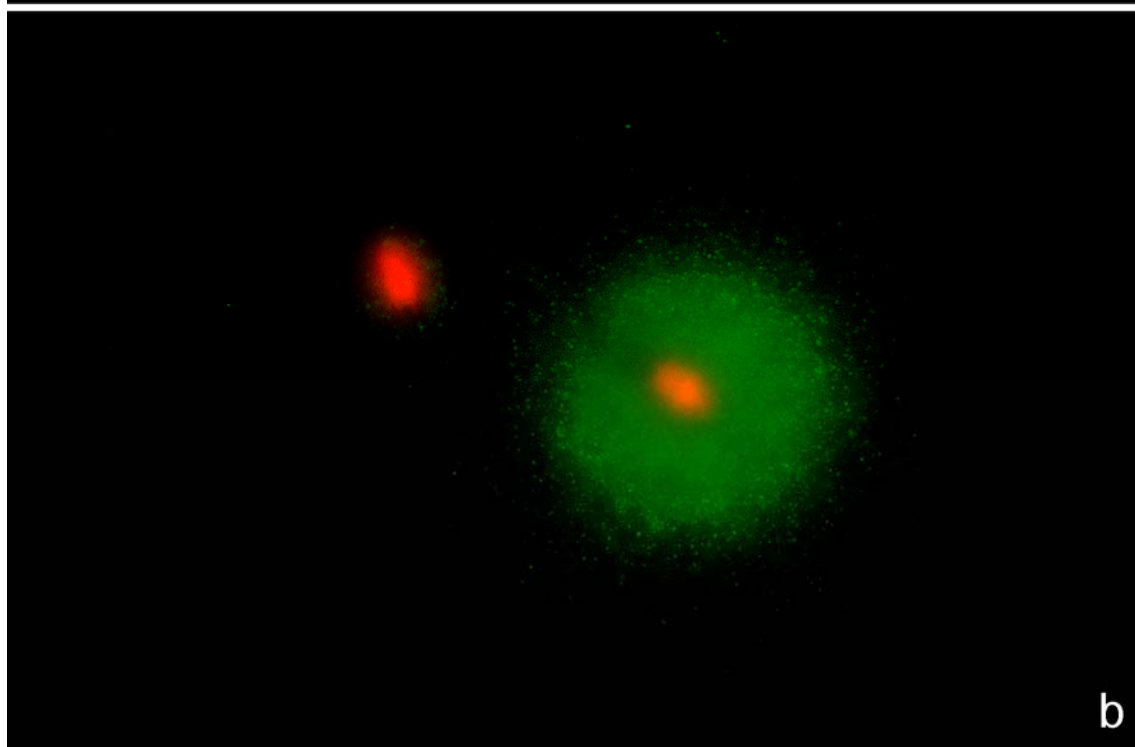
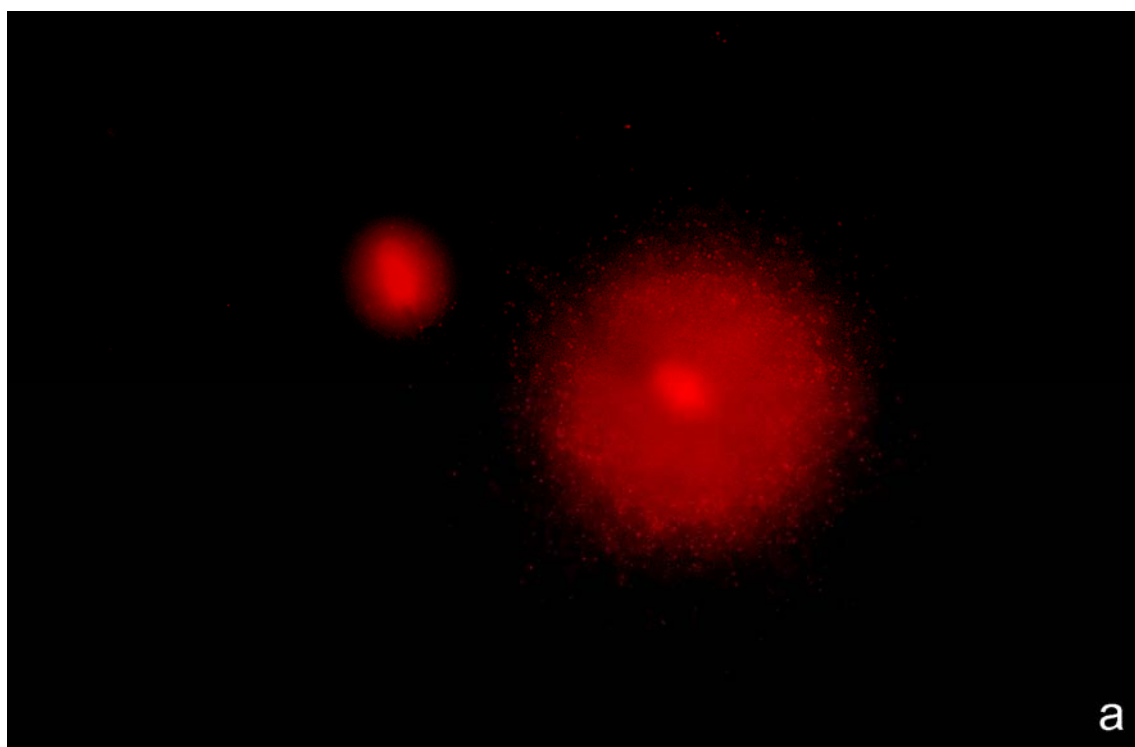
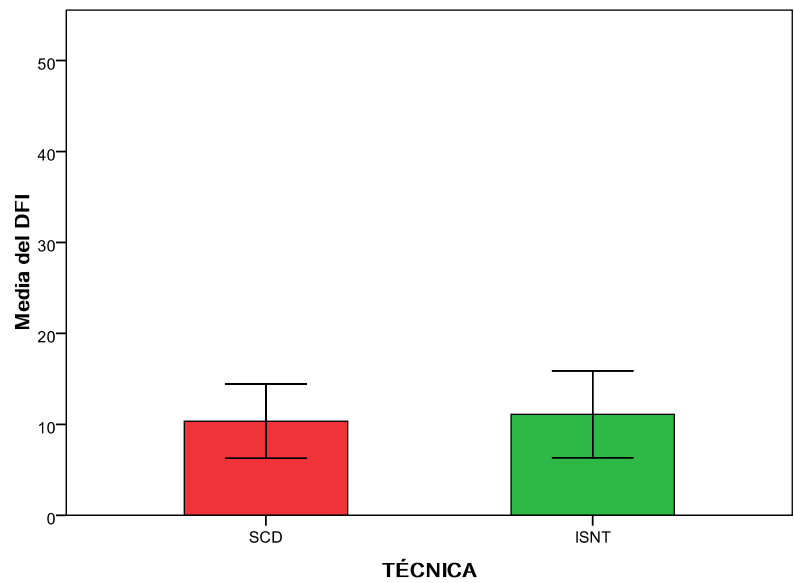
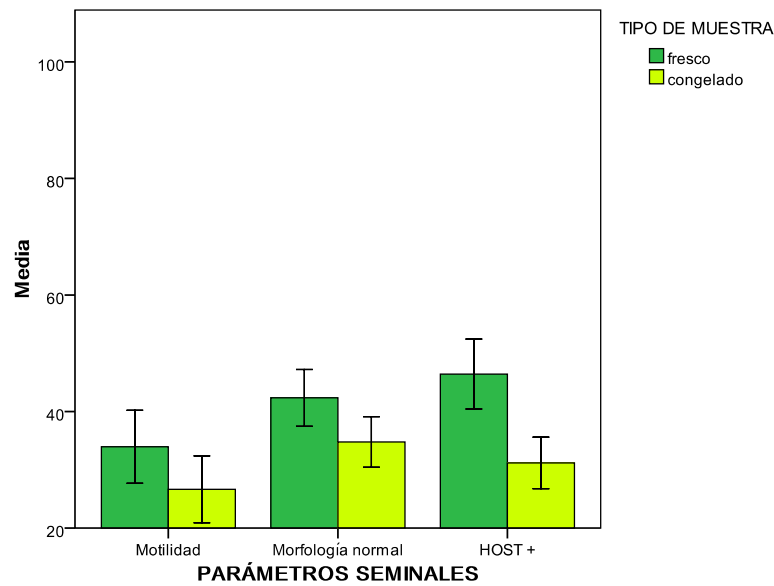


Figura 62. Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio de 19 muestras de semen pertenecientes a 19 individuos analizados mediante el test SCD y el ensayo ISNT. Se contaron 500 espermatozoides por muestra y técnica. No se encontraron diferencias significativas en los DFI's determinados por ambas técnicas.

Figura 63. Motilidad, morfología normal e integridad de la membrana plasmática (HOST +) medias de las muestras de semen frescas y descongeladas de los caballos analizados. Se encontraron diferencias significativas en la motilidad (U Mann Whitney, $p < 0,05$), morfología (ANOVA, $p < 0,05$) e integridad de membrana (U Mann Whitney, $p < 0,05$).

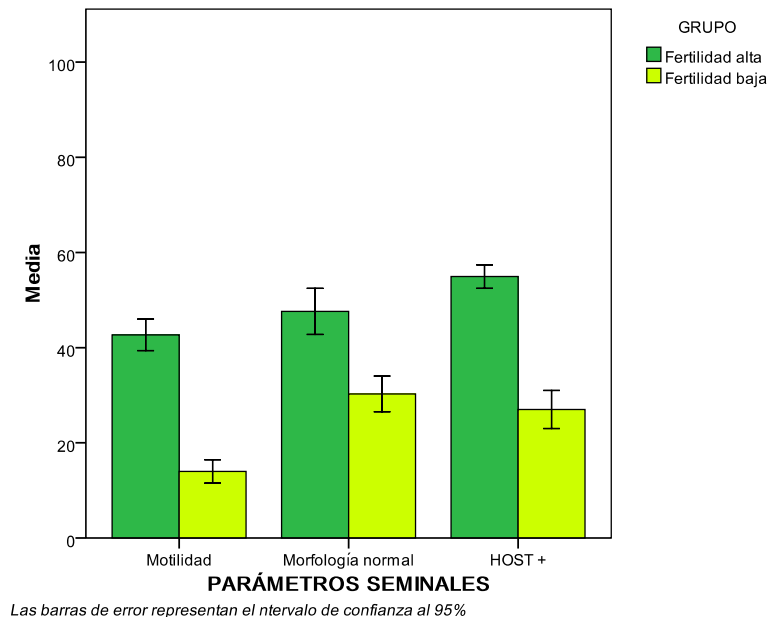


Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

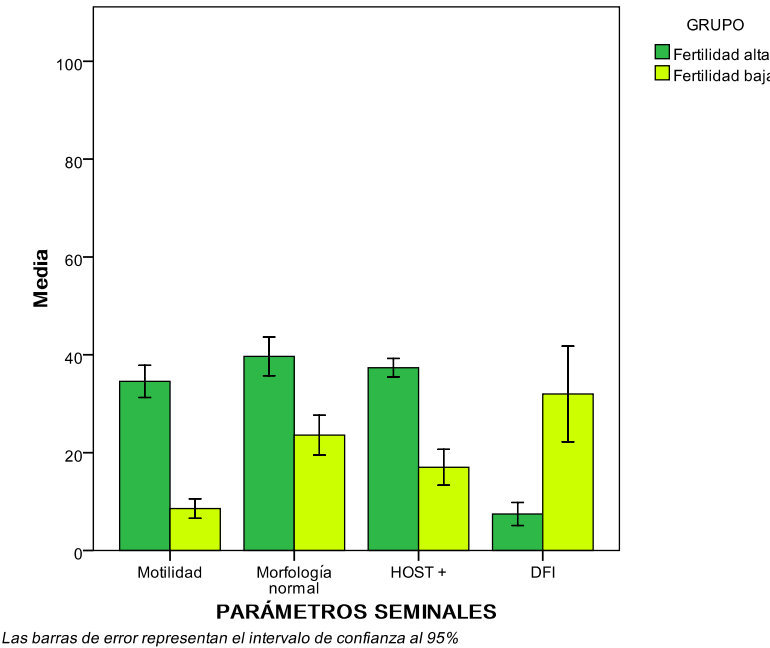


Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 64. Parámetros seminales de los grupos de caballos con fertilidad alta y baja. (a) Motilidad, morfología normal e integridad de la membrana plasmática (HOST +) medias de las muestras de semen frescas del grupo de caballos con fertilidad alta y baja. **(b)** Motilidad, morfología normal, integridad de la membrana plasmática (HOST +) e índice de fragmentación de ADN (DFI) de los espermatozoides de las muestras descongeladas del grupo de caballos con fertilidad alta y baja.



a



b

Figura 65. Test SCD modificado en espermatozoides de oveja. Tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de oveja procesados con el test SCD teñidos con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde).

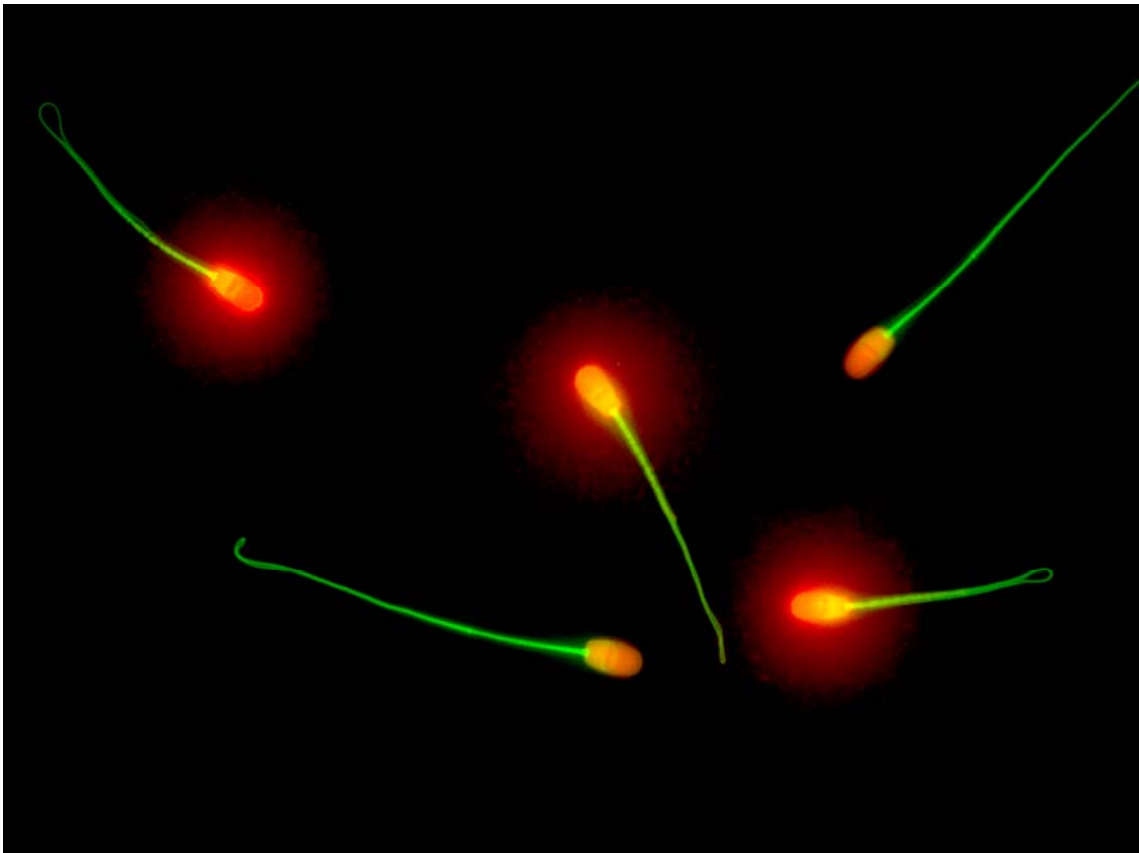


Figura 66. *In Situ* Nick Translation realizada sobre espermatozoides de oveja previamente procesados con el test SCD. (a) Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio. **(b)** Prueba de ISNT que detecta la presencia de roturas mediante la incorporación de nucleótidos marcados (verde) usando la ADN polimerasa I. Los nucleoides están contrateñidos con yoduro de propidio. Los nucleoides con halo grande de dispersión de la cromatina corresponden a núcleos espermáticos con el ADN fragmentado.

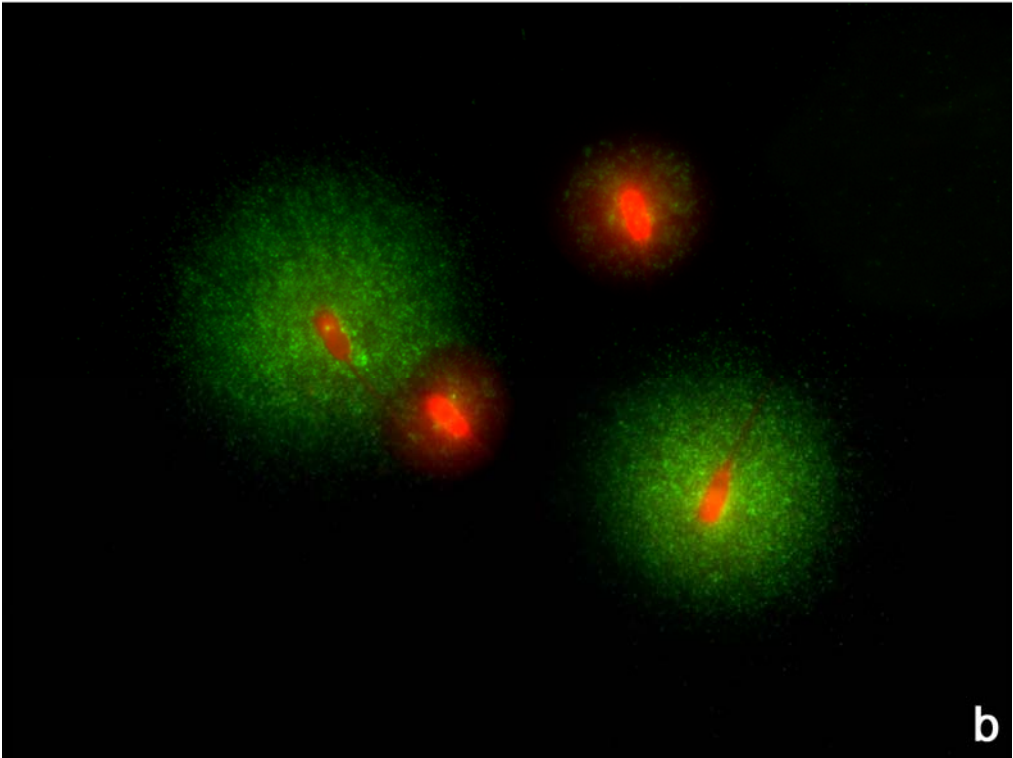
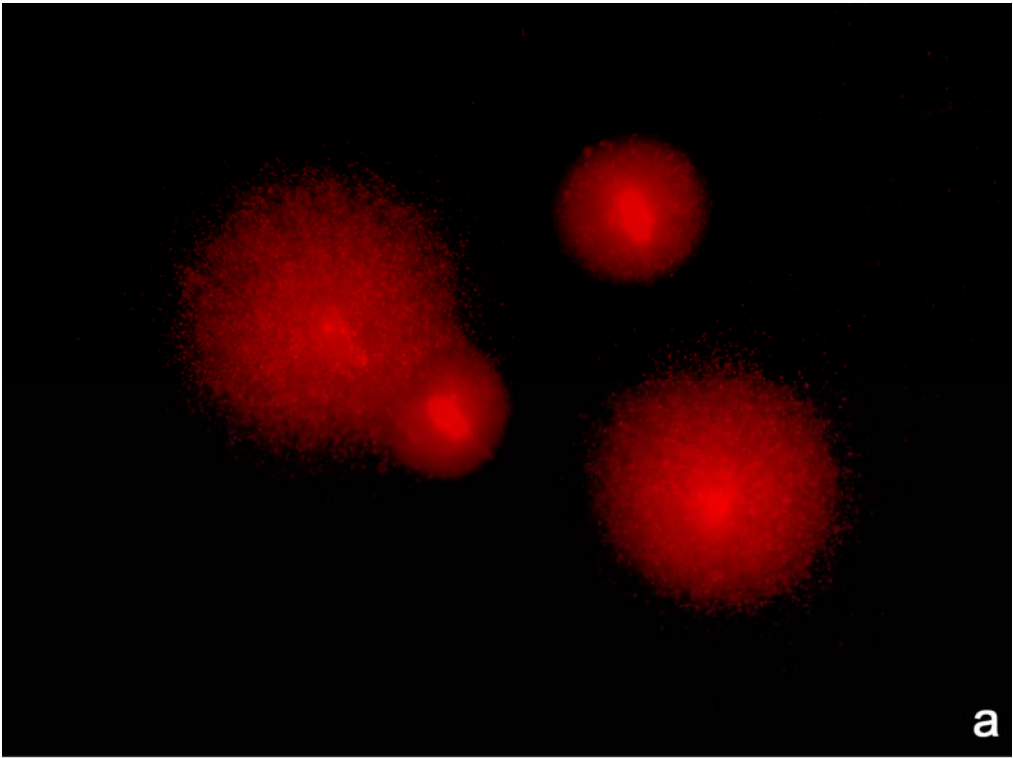
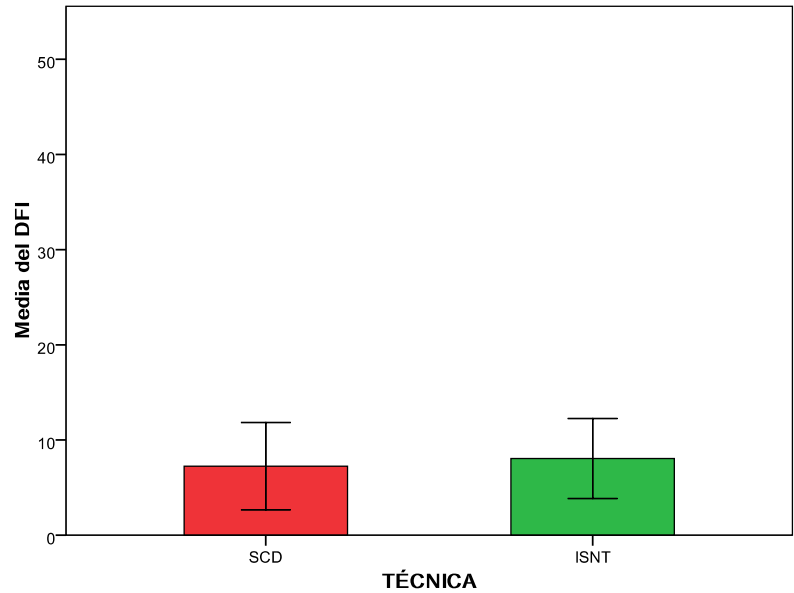


Figura 67. Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio y su intervalo de confianza de muestras de semen pertenecientes a 20 individuos analizados mediante el test SCD y el ensayo ISNT. Se contaron 500 espermatozoides por muestra y técnica. No se encontraron diferencias significativas en los DFIs determinados por ambas técnicas.



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 68. Test SCD en muestras de semen de ovejas vacunadas con Miloxan. (a) Muestra de semen control teñida con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína (verde). (b) Muestra de semen de un individuo 20 días después de la vacunación teñida con yoduro de propidio (rojo) y mercuridibromofluoresceína, la mayoría de las células muestran un gran halo de dispersión de cromatina.

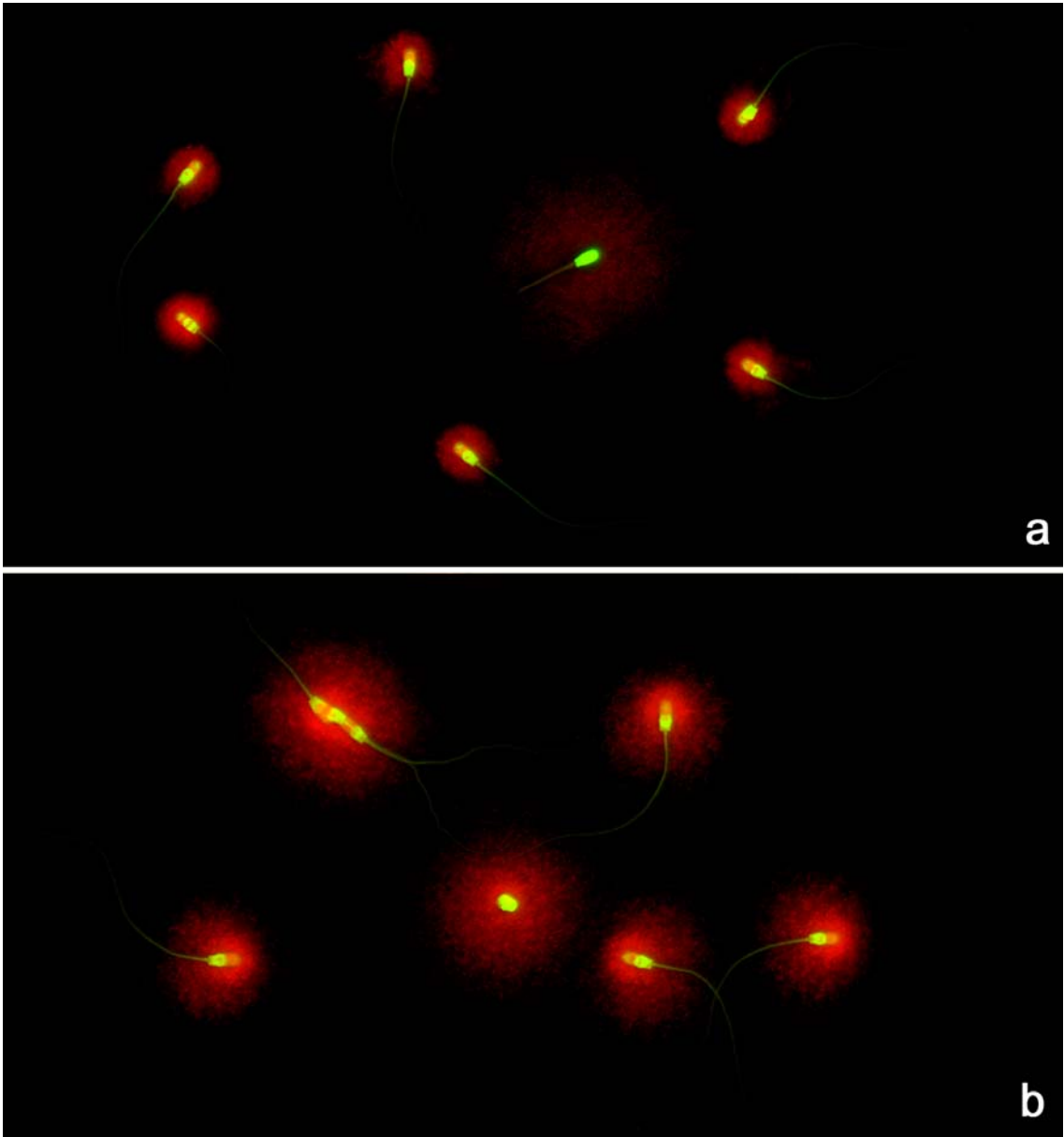
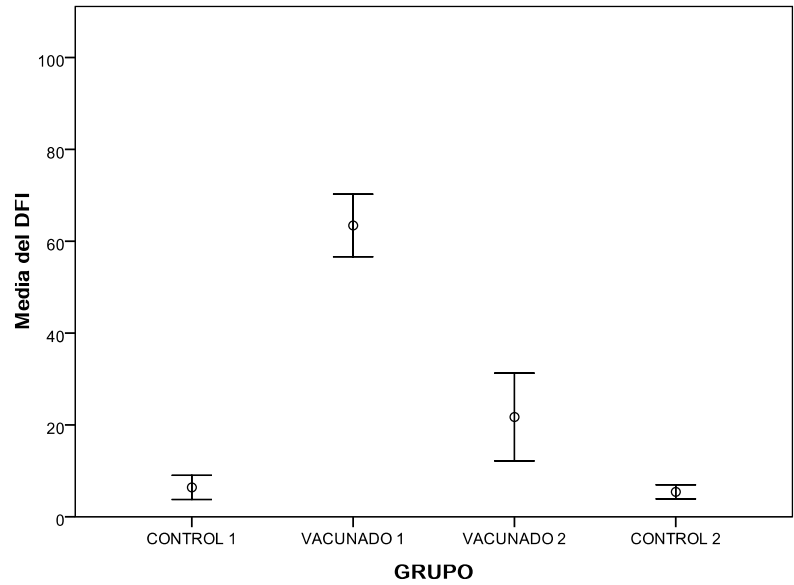


Figura 69. Índice de fragmentación de ADN (DFI) calculado en cada uno de los 4 grupos establecidos: grupo control 1 (CG1), grupo vacunado 1 (VG1), grupo vacunado 2 (VG2) y grupo control 2 (CG2). Se encontraron diferencias significativas en el DFI entre los grupos vacunados y los controles (ANOVA corrección de Bonferroni, $p < 0,05$).



Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%

Figura 70. El ensayo cometa en dos dimensiones (2D) en espermatozoides de koala. (a) Tipos de espermatozoides 2D obtenidos cuando una muestra de semen de koala se procesa con el protocolo del ensayo cometa 2D. 1 y 2, Espermatozoides sin roturas de ADN; 3, espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla. **(b)** Tipos de espermatozoides 2D obtenidos cuando una muestra de semen de koala se trata con una enzima de restricción y posteriormente se procesa con el protocolo del ensayo cometa 2D. 4, Espermatozoide sin roturas; 5, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena doble y sencilla; 6, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena doble y sencilla.

Figura 71. El ensayo cometa en dos dimensiones (2D) sobre espermatozoides de canguro. (a) Tipos de espermatozoides obtenidos cuando una muestra de semen de canguro se procesa con el protocolo del ensayo cometa 2D. 1, Espermatozoide sin roturas; 2, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla; 3, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla. **(b)** Tipos de espermatozoides obtenidos cuando una muestra de semen de canguro se trata con una enzima de restricción y posteriormente se procesa con el protocolo del ensayo cometa 2D. 4, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena doble y sencilla; 5, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena doble.

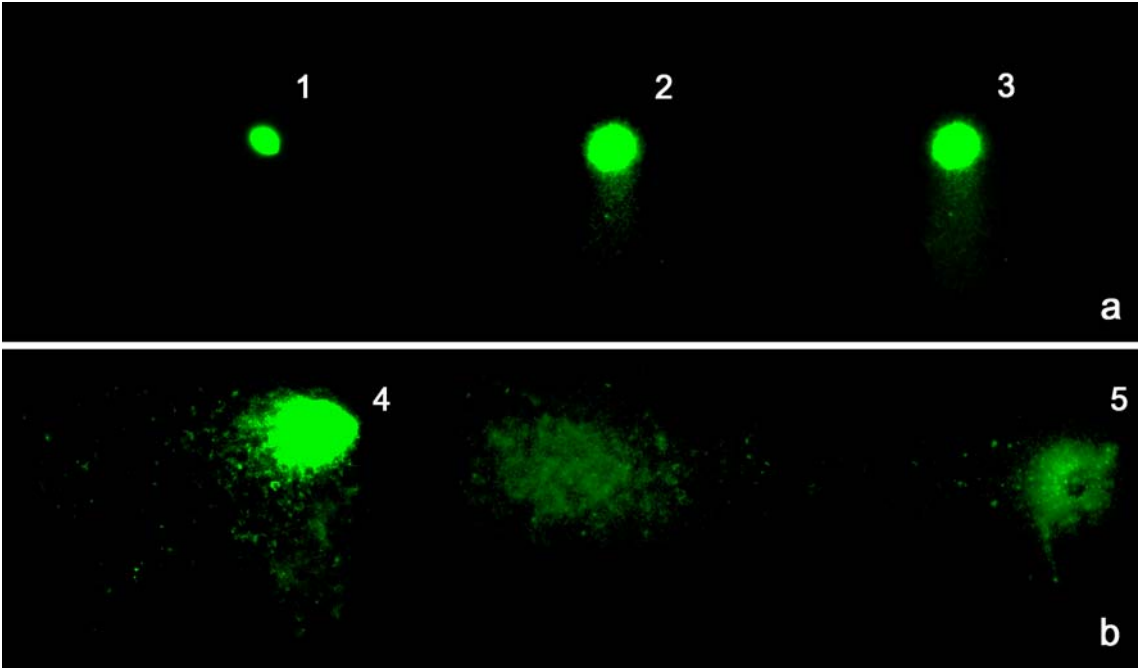
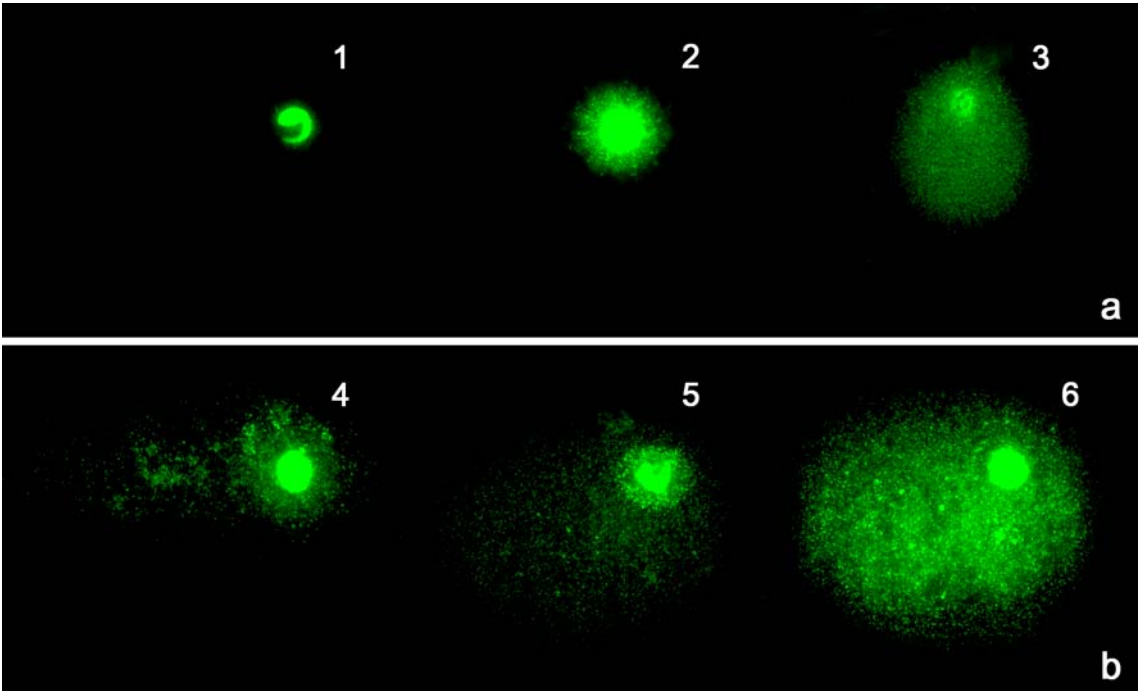


Figura 72. El ensayo cometa en dos dimensiones (2D) sobre espermatozoides de wombat. Tipos de espermatozoides obtenidos cuando una muestra de semen de wombat se procesa con el protocolo del ensayo cometa 2D. 1, 2, Espermatozoide sin roturas; 3, 4, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de cadena sencilla; 5, espermatozoide con un nivel alto de roturas de cadena sencilla.

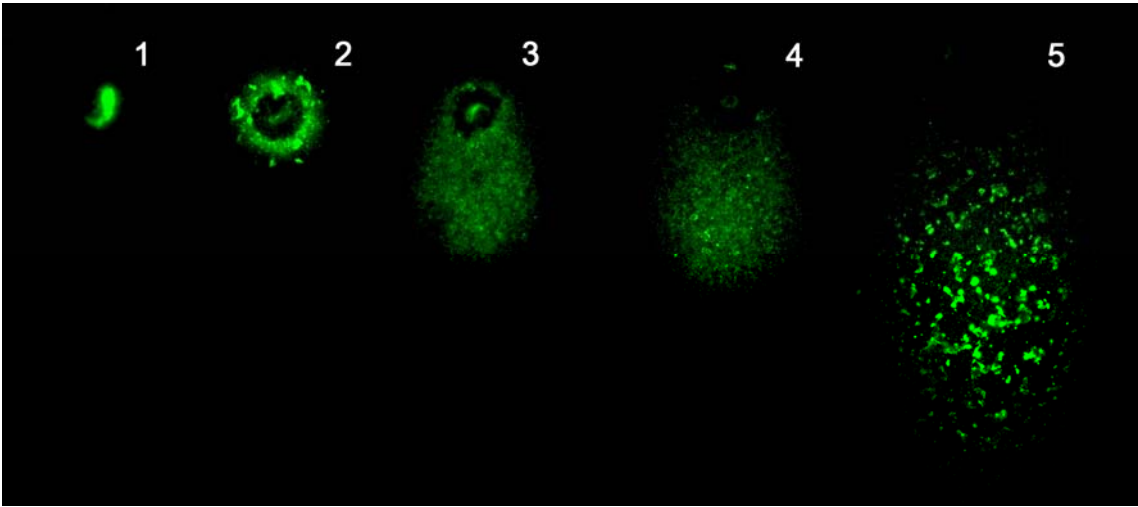
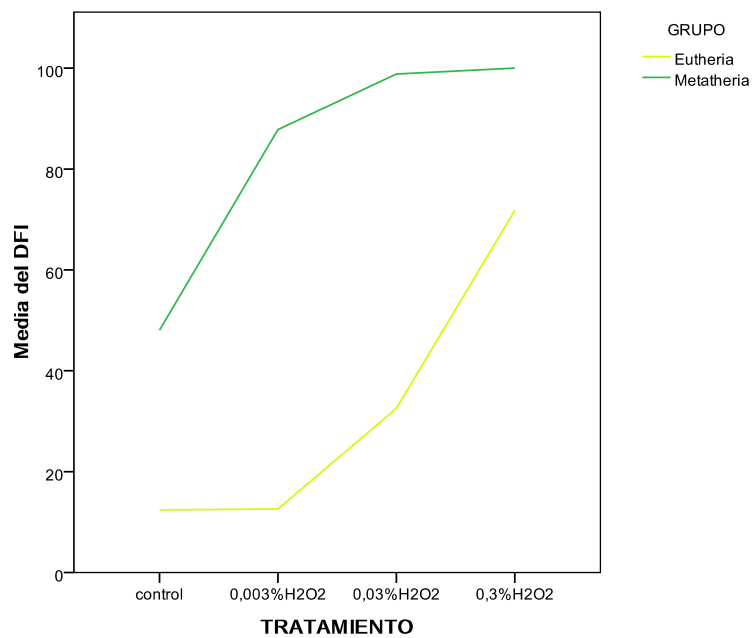
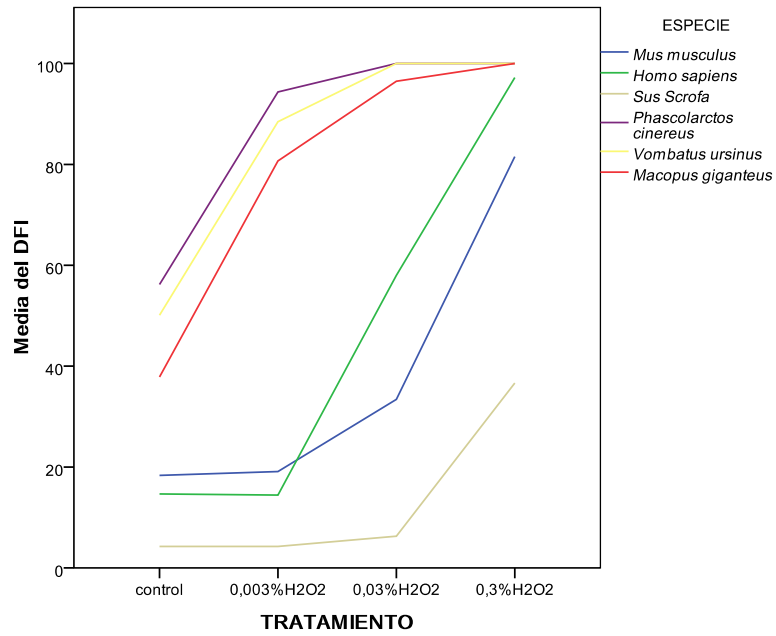


Figura 73. Índice de fragmentación de ADN (DFI) medio de las muestras de semen analizadas tratadas de manera independiente con concentraciones crecientes de H₂O₂. (a) DFI medio de las muestras de semen de cada uno de los grupos de mamíferos Eutheria y Metatheria analizados tratadas de manera independiente con concentraciones crecientes de H₂O₂. El índice de fragmentación aumenta con la concentración tanto en las muestras de espermatozoides de las especies Eutheria como en las de las especies Metatheria. En la muestras de especies Metatheria, el índice de fragmentación es significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) superior al de las especies Eutheria en todas las dosis de H₂O₂ utilizadas. En la dosis de H₂O₂ más baja, no se detecta ningún efecto en los núcleos espermáticos de las especies Eutheria. **(b)** DFI medio de las muestras de semen de cada una de las especies analizadas tratadas de manera independiente con concentraciones crecientes de H₂O₂.



a

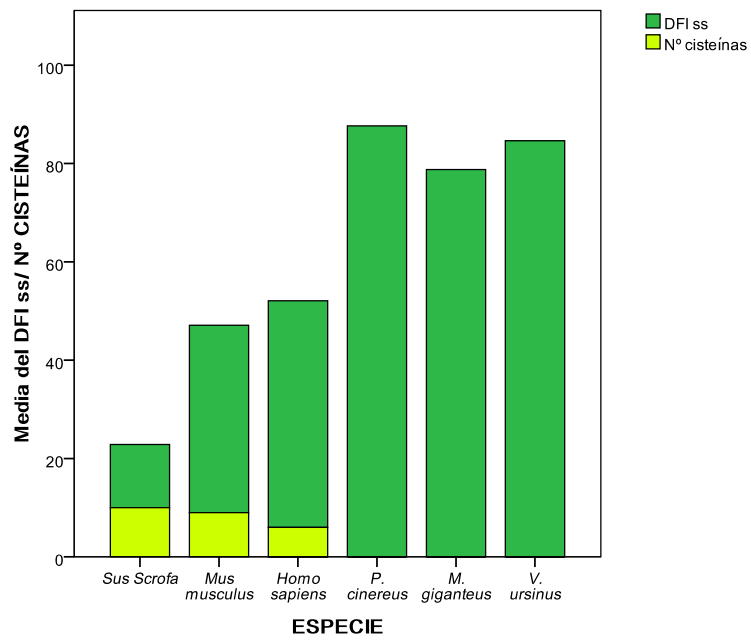


b

Figura 74. Secuencias alineadas de la protamina 1 de *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Sus scrofa domestica* (Ssd), *Phascolarctus cinereus* (Pc) y *Macropus giganteus* (Mg). El código de letras utilizado para la nomenclatura de los aminoácidos es el siguiente: A, alanina; C, cisteína; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; M, metionina; P, prolina; Q, glutamina-glutámico; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina. Los residuos de cisteína están señalados en verde. Secuencias extraídas de la base de datos GENE BANK (números de acceso: *Homo sapiens*, NP_002752; *Mus musculus*, NP_038665; *Sus scrofa domestica*, 0905175A; *Phascolarctus cinereus*, AAB88911; *Macropus giganteus*, AAA74604)

Figura 75. Índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) medio y número de cisteínas en la protamina 1 de cada una de las especies estudiadas.

		Número de aminoácido											
	
		5	15	25	35	45	55						
Hs	MARYRCCRSQ	SRSRYRQRQ	R-----SRRR	R---RRSCQT	RRRAMRCC--	--RPRYRPRC	RRH						
Mm	MARYRCCRSK	SRSRCRRRRR	R-----QRRR	R---RRCCRR	RRRRCCRR--	--RRSYTIRC	KKY						
Ssd	MARYRCCRSH	SRSRCRPRRR	R-----QRRR	R---RRCCPR	RRRAVCCR--	--RYT-VIRC	RRC						
Pc	MARYRHRSR	SRSRYQRRR	RRSRYRSQRR	RYRRRRGSRR	RRRRGRRR-G	Y-RRRYSRRR	RY-						
Mg	MARYRHRSR	SRSRYRRRRR	RRSRYRSRRR	RYRGRR--RR	RSRRGRRRRG	YSRRRYSRRR	RR-						



TABLAS

Tabla 1. Dimensiones (µm) de los espermatozoides de los mamíferos estudiados en este trabajo.

	Cabeza		Pieza intermedia		Pieza principal	Total	Referencias
	Longitud	Anchura	Longitud	Anchura	Longitud	Longitud	
<i>Bos Taurus</i>	6,77	4,21	9,83	-	36,93	53,53	(Morgenthal, 1967)
<i>Ovis Aries</i>	8,2	-	14,0	-	40-45	62,2-67,2	(Cummins y Woodall, 1985b)
<i>Sus Scrofa</i>	8,5	4,2	10,0	-	36,1	54,6	(Morgenthal, 1967)
<i>Equus caballus</i>	7,0	3,9	9,8	-	43,8	60,6	(Nishikawa et al. citados por Asdell 1964)
<i>Homo sapiens</i>	4-5	2,5-3	4,0	1,0	45	54,5-58,5	(WHO, 1999)
<i>Mus Musculus</i>	7,9	3,2	18,4	1,3	96,6	122,9	(Hirth, 1960)
<i>Macropus giganteus</i>	7,3	2,2	10,7	1,5	100,9	118,9	(Hughes, 1977)
<i>Phascolarctos cinereus</i>	11,75	3,32	9,60	0,96	63,5	83,01	(Cummings y Woodall 1985)
<i>Vombatus ursinus</i>	5,7	1,7	18,0	0,9	69,0	93,6	(Hughes, 1977)

Tabla 2. Variabilidad inter e intra observador. Frecuencias de cada uno de los tipos de espermatozoides: halo grande (HG), halo mediano (HM), halo pequeño (HP), sin halo (SH) y degradados (D) presentes en una muestra de semen, procesada con el test SCD y analizada por 4 técnicos en 6 conteos realizados en 2 días diferentes.

Técnico	día	%HG	%HM	%HP	%SH	%D	DFI
1	1	79,59	9,43	6,35	2,92	1,71	10,98
		80,57	9,45	5,53	2,85	1,60	11,76
		74,73	8,95	4,74	4,39	1,93	11,05
	2	78,63	8,43	5,29	4,51	3,14	12,94
		81,90	6,86	4,95	4,19	2,09	11,24
		78,64	9,64	4,33	4,33	2,95	11,61
	1	85,77	6,07	4,18	3,97	2,51	10,67
		88,73	1,67	8,14	1,25	2,92	12,32
		90,42	2,08	3,13	4,17	2,92	10,21
2	2	93,31	0,20	4,67	1,83	2,43	8,92
		86,13	6,31	5,40	3,60	2,20	11,20
		86,13	6,31	4,14	3,42	1,26	8,83
	1	65,03	23,63	6,43	2,46	2,46	11,34
		65,94	22,11	5,18	5,98	0,80	11,95
		63,06	24,36	8,25	3,54	0,79	12,57
	2	67,20	21,40	6,80	2,60	2,00	11,40
		66,91	22,30	7,25	1,86	1,67	10,78
		65,15	24,81	6,44	2,46	1,14	10,04
3	1	69,00	20,40	6,00	3,60	1,00	10,60
		66,67	20,96	8,18	3,39	0,80	12,38
		68,97	19,76	5,73	4,55	0,99	11,26
	2	71,40	17,60	4,60	5,00	1,40	11,00
		75,59	15,55	4,53	3,54	0,79	8,86
		79,92	11,02	4,53	3,54	0,98	9,06
	1	65,03	23,63	6,43	2,46	2,46	11,34
		65,94	22,11	5,18	5,98	0,80	11,95
		63,06	24,36	8,25	3,54	0,79	12,57
4	2	67,20	21,40	6,80	2,60	2,00	11,40
		66,91	22,30	7,25	1,86	1,67	10,78
		65,15	24,81	6,44	2,46	1,14	10,04
	1	69,00	20,40	6,00	3,60	1,00	10,60
		66,67	20,96	8,18	3,39	0,80	12,38
		68,97	19,76	5,73	4,55	0,99	11,26
	2	71,40	17,60	4,60	5,00	1,40	11,00
		75,59	15,55	4,53	3,54	0,79	8,86
		79,92	11,02	4,53	3,54	0,98	9,06

Tabla 3. Análisis de imagen digital en dos dimensiones. Parámetros medidos con *Leica Qwin Pro* en cada tipo de espermatozoide.

Tabla 4. Análisis de U de Mann Whitney ($p<0.05$) de los valores de los parámetros medidos con el soporte informático *Leica Q Win Pro* en cada tipo de espermatozoide.

Tipos de espermatozoides	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Redondez	Nivel de grises integrado	Media de grises	Varianza de grises
No fragmentados	2643965,03 $\pm 52313,13^*$	411167,83 $\pm 6915,13^*$	4968,68 \pm 129,72 *	2,2E+008 $\pm 689165^*$	83150,99 \pm 1666,07 *	3132938,99 $\pm 169766,9^*$
Fragmentados	1229111,11 $\pm 46904,04^*$	214641,98 $\pm 6995,07^*$	3150,88 \pm 202,98 *	1,3E+008 $\pm 1E007^*$	97949,58 \pm 5373,33 *	3108828,80 $\pm 373525,7^*$
Degradados	560784,31 \pm 35823,00 *	141352,94 $\pm 7067,12^*$	3143,31 \pm 272,32 *	50027333 $\pm 478587^*$	81319,76 \pm 4851,04 *	2408682,75 $\pm 364453,1^*$
Otras células	2789470,59 $\pm 155519,7^*$	256058,82 $\pm 12974,3^*$	1833,00 \pm 156,64 *	4,1E+008 $\pm 4E+007^*$	144609,65 $\pm 9963,18^*$	4602935,05 $\pm 503908,1^*$

Los valores son la media \pm error estándar.

* Las diferencias entre los tipos de espermatozoides son significativas, prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

(I) Tipo de espermatozoide	(J) Tipo de espermatozoide	Área (μm^2) p	Perímetro (μm) p	Redondez p	Nivel de grises integrado p	Media de grises p	Varianza de grises p
No fragmentado	Fragmentado	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,628	0,032*
	Degradado	0,000*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,337	0,003*
	Otra célula	0,210	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,003*
Fragmentado	Degradado	<0,001*	<0,001*	0,920	<0,001*	0,107	0,356
	Otra célula	<0,001*	0,013*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,031*
Degradado	Otra célula	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,002*

* Las medias de los tipos de espermatozoide I y J son significativamente distintas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Tabla 5. Análisis de imagen digital en tres dimensiones. Parámetros medidos con *Volocity* en cada tipo de espermatozoide.

Tipo de espermatozoide	Número de voxeles	Volumen (μm^3)	Media de grises	Suma de grises	Centroide X (μm)	Centroide Y (μm)	Centroide Z (μm)	Área superficial (μm^2)
Halo grande	11681,83 $\pm 498,35^*$	565,54 \pm 24,13*	93,93 \pm 1, 50*	1157211, 16 \pm 6513 6,24*	131,94 \pm 5,43*	107,26 \pm 5,76	10,74 \pm 0, 11*	1183,75 $\pm 32,95^*$
Halo mediano	9763,64 $\pm 897,66^*$	472,68 \pm 43,46*	94,03 \pm 3, 85*	1003530, 64 \pm 1203 37,08*	105,53 \pm 12,78*	129,84 \pm 11,38	9,62 \pm 0,2 4*	979,31 \pm 54,08*
Halo pequeño	9749,40 $\pm 866,63^*$	471,99 \pm 41,96*	103,55 \pm 6,14*	1125713, 68 \pm 1473 61,83*	116,80 \pm 14,59*	137,44 \pm 12,51	10,72 \pm 0, 26*	869,14 \pm 44,81*
Sin halo	9713,22 $\pm 912,31^*$	470,24 \pm 44,17*	120,34 \pm 4,74*	1206864, 33 \pm 1356 30,40*	122,92 \pm 13,28*	121,69 \pm 11,92	10,65 \pm 0, 46*	739,77 \pm 55,67*
Degradados	3093,11 $\pm 519,93^*$	149,74 \pm 25,17*	86,22 \pm 3, 33*	302379,5 2 \pm 55663 ,69*	99,12 \pm 8, 23*	116,21 \pm 9,04	10,48 \pm 0, 29*	332,50 \pm 40,67*
Otras células	23032,50 $\pm 1443,4$ 9*	1115,05 $\pm 69,88^*$	127,26 \pm 4,38*	2955566, 67 \pm 2324 90,74*	143,19 \pm 15,11*	98,98 \pm 1 0,38	10,88 \pm 0, 30*	1583,63 $\pm 76,06^*$

Los valores son la media \pm error estándar.

* Las diferencias entre los tipos de espermatozoides son significativas, prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Tabla 6. Análisis de U de Mann Whitney ($p<0.05$) de los valores de los parámetros medidos con *Velocity* en cada tipo de espermatozoide.

(I) Tipo de espermatozoide	(J) Tipo de espermatozoide	Número de voxels p	Volumen (μm^3) p	Media de grises p	Suma de grises p	Centroide X (μm) p	Centroide Y (μm) p	Centroide Z (μm) p	Área superficial (μm^2) p
Halo grande	Halo mediano	0,101	0,101	0,758	0,312	0,072	0,000*	0,003*	0,003*
	Halo pequeño	0,107	0,107	0,323	0,767	0,357	0,881	<0,001*	<0,001*
	Sin halo	0,073	0,0073	0,000*	0,598	0,481	0,563	<0,001*	<0,001*
	Degradado	<0,001*	<0,001*	0,013*	<0,001*	0,002*	0,373	<0,001*	<0,001*
	Otra célula	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,514	0,955	<0,001*	<0,001*
Halo mediano	Halo pequeño	0,748	0,748	0,269	0,364	0,695	0,005*	0,094	0,094
	Sin halo	0,702	0,702	<0,001*	0,333	0,380	0,053	0,010*	0,010*
	Degradado	<0,001*	<0,001*	0,096	<0,001*	0,712	0,021*	<0,001*	<0,001*
	Otra célula	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,069 ^a	0,006*	<0,001*	<0,001*
Halo pequeño	Sin halo	0,961	0,961	0,089	0,555	0,768	0,730	0,061	0,061
	Degradado	<0,001*	<0,001*	0,021*	<0,001*	0,417	0,591	<0,001*	<0,001*
	Otra célula	<0,001*	<0,001*	0,056	<0,001*	0,330	0,820	<0,001*	<0,001*
Sin halo	Degradado	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,193	0,975	<0,001*	<0,001*
	Otra célula	<0,001*	<0,001*	0,421	<0,001*	0,767	0,767	<0,001*	<0,001*
Degradado	Otra célula	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,016*	0,358	<0,001*	<0,001*

* Las diferencias entre los tipos de espermatozoide I y J son significativas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Tabla 7. Índice de fragmentación de ADN (DFI) e índice de degradación sobre el total de células fragmentadas (DDI/DFI) de las muestras de semen del grupo de pacientes con varicocele, pacientes infértiles normozoospermicos, pacientes infértiles con parámetros seminales anormales y hombres fértiles.

Tabla 8. Índice de fragmentación de ADN (DFI) en 10 muestras de semen de 10 individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a 34° y 37°C.

Tabla 9. Índice de degradación de ADN (DDI) en 10 muestras de semen de 10 individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a 34° y 37°C.

Grupo	DFI (%)	DDI/DFI (%)
Pacientes con varicocele	32,4±5,26*	23,9±3,04
Pacientes infértiles normozoospermicos	31,3±2,32*	11,1±1,39†
Pacientes infértiles con parámetros seminales anormales	36,6±1,53*	12,2±0,82†
Hombres fértiles	12,6±1,00	10,3±1,44†

Los valores son la media \pm error estándar.

* El grupo es significativamente distinto del grupo de hombres fértiles, U Mann Whitney, $p<0,05$.

† El grupo es significativamente distinto del grupo de pacientes con varicocele, U Mann Whitney, $p<0,05$.

T ^a	0h	3h	6h	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
34°	22,50±	32,20±	38,60±	69,67±	89,00±	97,33±	98,88±	99,50±	99,88±	100
C	2,68	4,04	5,44	7,80	5,50	1,78	1,13	0,50	0,13	
37°	22,50±	32,22±	38,33±	64,40±	84,50±	94,00±	96,37±	99,75±	100	100
C	2,68	4,98	4,83	6,31	5,56	3,04	0,67	0,25		

Los valores son la media \pm error estándar.

T ^a	0h	3h	6h	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
34°	6,50±0	9,70±1	10,80±1	14,22±1	18,13±3	24,33±5	31,38±6	41,50±1	45,25±1	59,38±9
C	,96	,20	,36	,95	,70	,99	,41	0,49	1,20	,60
37°	6,50±0	9,89±1	13,00±1	17,50±2	21,40±3	28,89±5	40,50±7	47,50±1	62,89±9,	72,56±7
C	,96	,90	,71	,98	,35	,82	,37	0,22	87	,75

Los valores son la media \pm error estándar.

Tabla 10. Índice de fragmentación de ADN (DFI) en 10 muestras de semen de 10 individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a distintas concentraciones de H₂O₂.

Tabla 11. Índice de degradación de ADN (DDI) en 10 muestras de semen de 10 individuos normozoospermicos incubadas durante 7 días a distintas concentraciones de H₂O₂ a 37°C.

H ₂ O ₂ (%)	0h	12h	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
0	22,90± 1,94	47,40± 7,42	67,40± 6,23	82,44± 6,22	87,00± 0,87	92,10± 0,41	97,4± 1,61	98,80± 0,29	100
0,003	22,90± 1,94	63,40± 7,75	83,60± 4,99	98,40± 0,88	99,45± 0,19	99,80± 0,13	100	100	100
0,03	22,90± 1,94	98,78±0 ,70	99,78±0 ,15	99,89±0 ,11	100	100	100	100	100

Los valores son la media ± error estándar.

H ₂ O ₂ (%)	0h	12h	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
0	8,60± 1,65	8,90± 2,05	12,40± 1,68	14,00± 2,85	17,40± 1,00	22,00± 0,62	25,80± 2,38	30,80± 0,68	36,70± 2,27
0,003	8,60± 1,65	16,00± 2,88	24,80± 3,70	39,40± 7,41	43,70± 0,932	48,00± 0,67	53,20± 7,50	63,10± 0,57	71,11± 6,40
0,03	8,60± 1,65	58,89± 10,07	78,44± 9,54	94,11± 3,90	96,60± 0,16	97,90± 0,28	100	100	100

Los valores son la media ± error estándar.

Tabla 12. Frecuencias absolutas de los tipos de cometa en dos dimensiones (2D) encontrados en una muestra de semen normozoospermica (control) tratada con H_2O_2 o digerida con Alu I ($n = 500$).

Tabla 13. Frecuencias absolutas de los tipos de cometa en dos dimensiones (2D) encontrados en una muestra de leucocitos humanos tratada con H_2O_2 o digerida con Alu I ($n = 500$).

Tratamiento	Sin daño	DSB bajo	DSB alto	SSB bajo	SSB alto	SSB bajo DSB bajo	SSB bajo DSB alto	SSB alto DSB bajo	SSB alto DSB alto
Control	423	4	0	18	48	2	2	1	2
H ₂ O ₂ (%)									
0,03	48*	2	1	296*	144*	1	3	3	2
0,15	2*	2	2	68*	421*	1	2	1	1
0,30	0*	1	2	24*	467*	1	2	1	2
Alu I (min)									
15	274*	25*	154	1*	12*	6	8*	0	20*
25	0*	2	143	0*	0*	0	322*	0	33*

DSB = roturas de ADN de cadena doble, SSB = roturas de ADN de cadena sencilla.

*Los valores son significativamente diferentes del control, χ^2 , $p < 0,05$.

Tratamiento	Sin daño	DSB bajo	DSB alto	SSB bajo	SSB alto	SSB bajo DSB bajo	SSB bajo DSB alto	SSB alto DSB bajo	SSB alto DSB alto
Control	394	16	1	25	31	14	8	6	5
H ₂ O ₂ (%)									
0,03	39*	12	2	302*	78*	21	15	26	5
0,15	0*	17	3	42*	385*	13	12	20	8
0,30	0*	18	2	10*	423*	15	11	11	10
Alu I (min)									
15	144*	46*	183	5*	19*	42	17*	32	12*
25	0*	00	282	0*	12*	133	29*	24	20*

DSB = roturas de ADN de cadena doble, SSB = roturas de ADN de cadena sencilla.

*Los valores son significativamente diferentes del control, χ^2 , $p < 0,05$.

Tabla 14. Análisis de comparación múltiple. El análisis de comparación múltiple indicó que las variables Media de grises y Mínimo de grises juntas presentan valores significativamente distintos en todos los tipos de cometa analizados. Estas dos variables serían capaces de clasificar las células analizadas en cada uno de los tipos de cometa establecidos *de visu*.

Tipo celular I	Tipo celular J	P valor	
		Media de grises	Mínimo de grises
Normal	SSB bajo	<0,001	0,017
	SSB alto	<0,001	0,001
	DSB alto SSB bajo	<0,001	<0,001
	DSB alto SSB alto	<0,001	1,000
SSB bajo	Normal	<0,001	0,017
	SSB alto	<0,001	1,000
	DSB alto SSB bajo	<0,001	<0,001
	DSB alto SSB alto	<0,001	1,000
SSB alto	Normal	<0,001	0,001
	SSB bajo	<0,001	1,000
	DSB alto SSB bajo	<0,001	0,005
	DSB alto SSB alto	<0,001	1,000
DSB alto SSB bajo	Normal	<0,001	<0,001
	SSB bajo	<0,001	<0,001
	SSB alto	<0,001	0,005
	DSB alto SSB alto	0,671	0,010
DSB alto SSB alto	Normal	<0,001	0,179
	SSB bajo	<0,001	1,000
	SSB alto	<0,001	1,000
	DSB alto SSB bajo	0,671	0,010

DSB = roturas de ADN de cadena doble, SSB = roturas de ADN de cadena sencilla.

**Las diferencias entre el tipo celular I y J son significativas, ANOVA, $p < 0,05$.*

Tabla 15. Variabilidad inter e intra ensayo del cometa en dos dimensiones (2D). Frecuencias de los tipos de cometa 2D encontrados en cinco ensayos diferentes (A,B,C,D,E) y la variabilidad inter-ensayo estimada. Frecuencias de los tipos de cometa 2D encontrados en cinco medidas del mismo ensayo (A,1-5) y la variabilidad intra-ensayo estimada. DFI= Índice de fragmentación de ADN.

Ensayo	Sin daño	SSB bajo	SSB alto	DSB bajo	DSB alto	SSB bajo DSB bajo	SSB alto DSB alto	SSB- DFI	DSB- DFI
A	81,1	3,0	9,0	4,0	1,5	0,6	0,8	13,4	6,9
B	80,4	3,6	9,6	3,6	2,0	0,4	0,4	14,0	6,4
C	82,4	3,2	8,0	4,2	1,0	0,6	0,6	12,4	6,4
D	78,4	3,6	9,6	4,6	2,2	0,8	0,8	14,8	8,4
E	77,1	4,0	9,4	5,0	2,5	1,0	1,0	15,4	9,5
Variabilidad	79,88±	3,48±	9,12±	4,28±	1,84±	0,68±	0,72±	14±	7,52±
Intra ensayo	1,9	0,35	0,60	0,48	0,53	0,20	0,20	1,05	1,23
A1	76,7	3,9	10,0	5,1	1,2	1,6	1,5	17,0	9,4
A2	79,0	3,8	9,0	5,2	1,0	1,0	1,0	14,8	8,2
A3	76,9	4,1	9,2	6,0	1,4	1,2	1,2	15,7	9,8
A4	77,8	3,7	8,9	4,8	1,2	1,8	1,8	16,2	9,6
A5	75,2	4,5	10,0	5,0	2,0	1,3	2,0	17,8	10,3
Variabilidad	77,12±	4±0,28	9,42±	5,22±	1,36±	1,38±	1,5±	16,3±	9,46±
Inter ensayo	1,26		0,48	0,41	0,41	0,29	0,37	1,04	0,70

DSB = roturas de ADN de cadena doble, SSB = roturas de ADN de cadena sencilla.

Los valores de la variabilidad intra e inter ensayo son la media ± desviación estándar.

Tabla 16. Volumen, concentración, motilidad, índice de fragmentación de ADN (DFI-SCD), índice de degradación (DDI), índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de las muestras analizadas antes y después de la recuperación mediante gradientes y *swim up*.

Tabla 17. Volumen, concentración, motilidad, índice de fragmentación de ADN (DFI-SCD), índice de degradación (DDI), índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de las muestras de semen puro y de las muestras recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.

Parámetros seminales	Semen puro	Semen recuperado Gradiente de densidad	Semen recuperado <i>Swim up</i>
Volumen (ml)	3,34±0,13	0,34±0,11*	0,35±0,002*
Concentraci3n (x10 ⁶ /ml)	52,23±2,54	26,13±2,68*	39,67±2,21*
Motilidad (%A + % B)	53,30%±1,08%	82,71%±1,98%*	82,82%±0,96%*
DFI-SCD (%)	28,88%±1,31%	7,63%±2,19%*	15,38%±1,49%*
DDI (%)	8,76%±0,56%	2,31%±0,83%*	2,90%±0,45%*
DFI ss (%)	45,26%±3,22%	19,50%±7,95%*	39,76%±3,68%
DFI ds (%)	13,93%±1,19%	5,50%±2,12%*	5,43%±0,93%*

Los valores son la media ± error estándar.

* El grupo es significativamente distinto del semen puro o total, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Parámetros seminales	Semen puro		Semen recuperado	
	Espermiograma normal si	Espermiograma normal no	Espermiograma normal si	Espermiograma normal no
Volumen (ml)	3,42±0,17	3,46±0,23	0,35±0,003	-
Concentraci3n (x10 ⁶ /ml)	58,16±3,97*	48,04±3,77*	43,01±2,24*	13,62%±3,08*
Motilidad (%A + B)	60,96%±0,98%*	44,23%±1,38%*	82,98%±0,87%	81,21%±3,97%
DFI-SCD (%)	25,24%±1,76%*	32,31%±2,08%*	2,53%±0,41%*	7,08%±2,20%*
DDI (%)	7,03%±0,63%*	10,57%±0,99%*	40,45%±4,04%	42,23%±11,61%
DFI ss (%)	45,31%±4,34%	41,76%±5,27%	39,00%±4,01%	41,15%±11,67%
DFI ds (%)	12,78%±1,58%	15,14%±2,01%	5,29%±1,04%	7,00%±2,34%

Los valores son la media ± error estándar.

* Las diferencias entre las muestras normozoospermicas y las no normozoospermicas son significativas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Tabla 18. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros volumen, concentración, motilidad, índice de fragmentación de ADN (DFI-SCD), índice de degradación (DDI), índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de las muestras de semen puro y recuperadas normozoospermicas y no normozoospermicas.

	Volumen	Concentración	Motilidad (%A+B)	DFI-SCD	DDI	DFI ss	DFI ds
Volumen	1,000*						
Concentración	-0,232*	1,000*					
Motilidad (%A+B)	-0,709*	-0,234*	1,000*				
DFI-SCD	0,475*	0,147*	-0,539*	1,000*			
DDI	0,570*	0,101	-0,561*	0,705*	1,000*		
DFI ss	0,138*	0,093	-110	0,252*	0,205*	1,000*	
DFI ds	0,397*	0,183*	-0,468*	0,556*	0,500*	0,234*	1,000*

* La correlación Rho de Spearman es significativa, $p < 0,05$.

Tabla 19. Regresión lineal. Análisis de regresión lineal del índice de fragmentación de ADN calculado con el test SCD (DFI-SCD) y del índice de degradación de ADN (DDI) con el índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds).

Tabla 20. Volumen, concentración, motilidad, índice de fragmentación de ADN (DFI-SCD), índice de degradación (DDI), índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) de las muestras de semen recuperadas utilizadas en inseminación artificial intrauterina (IUI) con resultado de embarazo positivo y negativo.

Variable independiente	Variable dependiente	R ²	p
DFI-SCD	DFI ss	R ² =0,032*	0,005
	DFI ds	R ² =0,277*	0,000
DDI	DFI ss	R ² =0,008	0,152
	DFI ds	R ² =0,058*	0,000

* La regresión lineal es significativa, $p < 0,05$.

Parámetros seminales	Embarazo si	Embarazo no
Volumen (ml)	-	0,35±0,001
Concentracion (x10 ⁶ /ml)	48,25±7,14*	34,53±2,43*
Motilidad (%A + B)	82,04%±2,25%	83,18%±0,93%
DFI-SCD (%)	23,69%±5,83%	13,81%±1,54%
DDI (%)	3,75%±1,53%	3,09%±0,59%
DFI ss+ds (%)	49,75%±10,28%	35,06%±4,32%
DFI ss (%)	48,63%±1,47%	33,61%±4,31%
DFI ds (%)	6,56%±2,27%*	4,81%±0,71%*

Los valores son la media ± error estándar.

* Las diferencias entre los grupos son significativas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Tabla 21. Volumen, concentración, motilidad, índice de fragmentación de ADN (DFI-SCD), índice de degradación (DDI), índice de fragmentación de ADN de cadena sencilla (DFI ss) y doble (DFI ds) (media \pm error estándar) del semen total y recuperado de las muestras utilizadas en FIV/ICSI con éxito y fracaso de embarazo.

Tabla 22. Valores de los parámetros medidos mediante análisis de imagen en los dos tipos de espermatozoides presentes en una muestra de semen de cerdo procesada con el test SCD.

Tabla 23. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación de ADN (DFI), motilidad, integridad acrosómica y de membrana.

Parámetros seminales	Semen puro		Semen recuperado	
	Embarazo si	Embarazo no	Embarazo si	Embarazo no
Volumen (ml)	3,26±0,28	4,39±0,65	-	-
Concentracion (x10 ⁶ /ml)	50,38±6,67	43,40±5,42	36,50±6,74	32,75±4,59
Motilidad (%A + B)	52,88%±2,08%	53,69%±1,26%	82,23%±1,46%	83,15%±1,07%
DFI-SCD (%)	24,06%±2,35%*	39,90%±5,61%*	14,69%±3,17%	15,00%±5,03%
DDI (%)	6,88%±0,87%	11,60%±2,52%	2,00%±0,78%	3,88%±1,26%
DFI ss+ds (%)	46,69%±8,55%	50,20%±8,90%	29,75%±8,81%*	57,88%±15,50%*
DFI ss (%)	44,13%±8,98%	42,80%±9,85%	29,69%±8,83%	55,75%±16,42%
DFI ds (%)	10,06%±2,53%	20,10%±6,72%	2,88%±0,96%	3,75%±2,13%

Los valores son la media ± error estándar.

* Las diferencias entre los grupos son significativas, U Mann Whitney, $p<0,05$.

Tipo de espermatozoide	Píxeles	Suma de grises	Media de grises
Fragmentado	32290,93±2158,56*	1,3481E6±39603,42*	47,18±1,68*
No fragmentado	17342,26±1165,34*	960326,56±37936,96*	60,20±3,55*

Los valores son la media ± error estándar.

* Las diferencias entre los grupos son significativas, U Mann Whitney, $p<0,05$.

	DFI	Motilidad	Integridad acrosómica	Integridad de membrana
DFI	1,000			
Motilidad	0,612*	1,000		
Integridad acrosómica	0,610*	0,938*	1,000	
Integridad de membrana	0,626*	0,924*	0,911*	1,000

* La correlación es significativa, Rho de Spearman, $p<0,05$.

Tabla 24. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros indicadores de la calidad seminal: índice de fragmentación de ADN (DFI), motilidad, integridad acrosómica y de membrana en muestras incubadas en tampón fosfato y Acromax a 34 y 37°C.

		DFI	Motilidad	Integridad acrosómica	Integridad de membrana
Acromax 15°C	DFI	1,000			
	Motilidad	0,112	1,000		
	Integridad acrosómica	-0,079	0,756*	1,000	
	Integridad de membrana	-0,087	0,825*	0,738*	1,000
		DFI	Motilidad	Integridad acrosómica	Integridad de membrana
Acromax 37°C	DFI	1,000			
	Motilidad	-0,048	1,000		
	Integridad acrosómica	-0,113	0,962*	1,000	
	Integridad de membrana	-0,099	0,948*	0,956*	1,000
		DFI	Motilidad	Integridad acrosómica	Integridad de membrana
PBS 15°C	DFI	1,000			
	Motilidad	-0,861*	1,000		
	Integridad acrosómica	-0,906*	0,968*	1,000	
	Integridad de membrana	-0,886*	0,957*	0,969*	1,000
		DFI	Motilidad	Integridad acrosómica	Integridad de membrana
PBS 37°C	DFI	1,000			
	Motilidad	-0,791*	1,000		
	Integridad acrosómica	-0,748*	0,922*	1,000	
	Integridad de membrana	-0,787*	0,990*	0,921*	1,000

* La correlación es significativa, Rho de Spearman, $p < 0,05$.

Tabla 25. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros seminales: índice de fragmentación (DFI), concentración, vitalidad, anomalías morfológicas, integridad acrosómica, integridad de membrana y motilidad progresiva.

	DFI (%)	Concentración (millones /ml)	Vitalidad (%)	Anomalías morfológicas (%)	Integridad acrosómica (%)	Integridad de membrana (%)	Motilidad progresiva (%)
DFI (%)	1,000						
Concentración (millones/ml)	0,194	1,000					
Vitalidad (%)	0,098	0,031	1,000				
Anomalías morfológicas (%)	0,086	-0,179	0,246	1,000			
Integridad acrosómica (%)	0,340	0,418	-0,645 *	-0,223	1,000		
Integridad de membrana (%)	0,239	0,147	0,750 *	0,230	-0,601 *	1,000	
Motilidad progresiva (%)	0,083	0,220	0,587 *	-0,065	-0,273	0,731 *	1,000

* La correlación es significativa, Rho de Spearman, $p < 0,05$.

Tabla 26. Anomalías morfológicas *major* y *minor* en espermatozoides de toro (Blom 1973).

Anomalías morfológicas <i>major</i>	Anomalías morfológicas <i>minor</i>
Poco desarrollado	Cabeza estrecha
Forma doble	Cabeza estrecha pequeña
Defecto de acrosoma*	Cabeza gigante
"Diadem defect" o diadema de cráteres*	Cabeza suelta normal
Cabeza en forma de pera	Membrana acrosómica desprendida
Cabeza estrecha en la base	Implantación anómala de la cola
Contorno anormal	Gota citoplasmática distal
Cabeza pequeña anormal	Cola truncada
Cabeza suelta anormal*	Cola enrollada
Corkscrew defect	Otras células
"Stump tail" o cola corta*	
Gota citoplasmática proximal	
Pseudogota	
"Dag" defect o alteración de la pieza intermedia	
Cuello roto	

* Anomalías de origen genético.

Tabla 27. Anomalías morfológicas *major* y *minor* presentes en los espermatozoides con el ADN fragmentado, no fragmentado y en el total de espermatozoides encontrados en las 18 muestras analizadas.

Anomalías morfológicas	Espermatozoides no fragmentados	Espermatozoides fragmentados	Espermatozoides Total
<i>Major</i>			
Formas dobles	0,00 ± 0,00 *	2,55 ± 1,04 *	1,28 ± 0,56
Cabeza en forma de pera	0,08 ± 0,04 *	5,77 ± 1,91 *	2,92 ± 1,06
Cabeza estrecha en la base	0,00 ± 0,00	3,03 ± 1,76	1,52 ± 0,90
Cabeza pequeña anormal	0,00 ± 0,00 *	5,52 ± 1,08 *	2,76 ± 0,72
Cabeza libre anormal	0,33 ± 0,13 *	15,47 ± 2,69 *	7,90 ± 1,87
"Stump tail" o cola corta	0,00 ± 0,00 *	5,15 ± 1,22 *	2,57 ± 0,75
Cola en látigo	0,02 ± 0,02	4,25 ± 1,76	2,14 ± 0,94
Gota citoplasmática proximal	0,00 ± 0,00	2,37 ± 1,23	1,19 ± 0,64
"Dag" defect o alteración de la pieza intermedia	0,66 ± 0,28	3,54 ± 1,90	2,10 ± 0,98
Total <i>Major</i>	1,30 ± 0,39 *	46,88 ± 4,93 *	7,07 ± 0,98
<i>Minor</i>			
Cabeza gigante	0,23 ± 0,11	2,71 ± 1,45	1,47 ± 0,75
Cola truncada	0,58 ± 0,32	1,72 ± 1,03	1,15 ± 0,54
Cola enrollada	13,02 ± 1,88 *	5,87 ± 1,70 *	9,45 ± 1,40
Total <i>Minor</i>	16,78 ± 2,46	14,46 ± 3,22	16,90 ± 2,26
Total <i>Major + Minor</i>	18,08 ± 2,66 *	61,34 ± 5,00 *	23,97 ± 2,40

Los valores son la media ± error estándar.

* Las diferencias entre los espermatozoides fragmentados y no fragmentados son significativas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

Tabla 28. Índice de fragmentación, índice de maduración con cromomicina A3 (CMA3+), índice de maduración con azul de anilina (AB+) medios de los espermatozoides presentes en cada una de las tres regiones macroscópicas del epidídimo estudiadas. El índice de fragmentación calculado para los espermatozoides de la región *caput* del epidídimo es significativamente (ANOVA y corrección de Bonferroni, $p<0.05$) superior a la de los espermatozoides del *corpus* y *cauda*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los índices de maduración calculados en cada una de las tres regiones del epidídimo.

Tabla 29. Parámetros evaluados en el grupo de los 19 caballos analizados en muestras de semen fresco y congelado.

	DFI (%)	CMA3+ (%)	AB+ (%)
<i>Caput</i>	53,29±4,49*	1,14±0,26	0,57±0,30
<i>Corpus</i>	27,71±1,43*	1,00±0,31	0,71±0,36
<i>Cauda</i>	18,86±1,95*	0,71±0,18	0,43±0,20

Los valores son la media \pm error estándar.

*Las diferencias son significativas, ANOVA, $p<0,05$.

Parámetros seminales	Semen fresco	Semen congelado
Motilidad (%)	33,957±3,02*	26,265±2,77*
Nº total de espermatozoides ($\times 10^9$)	4,441±0,54	-
Morfología anormal (%)	42,348±2,35**	34,782±2,09**
Anchura del escroto (cm)	9,513±0,05	-
Integridad de membrana (%)	46,435±2,89*	31,174±2,13*
Tasa de embarazo	71,783±1,99	-
Nº de servicios por embarazo	2,826±0,31	-
Índice de fragmentación	-	14,93±2,77

Los valores son la media \pm error estándar.

*Las diferencias entre los grupos son significativas, $p<0,05$, U Mann Whitney test.

**Las diferencias entre los grupos son significativas, $p<0,05$, ANOVA.

Tabla 30. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros evaluados en las muestras de semen fresco.

Tabla 31. Correlaciones. Correlaciones de los parámetros evaluados en las muestras de semen descongelado.

	Motilidad	Morfología normal	Integridad de membrana	Tasa de embarazo	NSE	DFI (%)
Motilidad	1,000					
Morfología normal	0,717*	1,000				
Integridad de membrana	-0,481*	-0,508*	1,000			
Tasa de embarazo	0,706*	0,680*	-0,744*	1,000		
NSE	-0,649*	-0,554*	0,624*	-0,761*	1,000	
DFI	-0,693*	-0,676*	0,347	-0,527*	0,630*	1,000

DFI=Índice de fragmentación. NSE= Número de servicios por embarazo.

* La correlación es significativa, Rho Spearman, $p < 0,05$.

	Motilidad	Morfología normal	Integridad de membrana	Tasa de embarazo	NSE	DFI (%)
Motilidad	1,000					
Morfología normal	0,733*	1,000				
Integridad de membrana	0,716*	0,781*	1,000			
Tasa de embarazo	0,676*	0,645*	0,609*	1,000		
NSE	-0,624*	-0,560*	-0,659*	-0,761*	1,000	
DFI	-0,739*	-0,687*	-0,687*	-0,527*	0,630*	1,000

DFI=Índice de fragmentación. NSE= Número de servicios por embarazo.

* La correlación es significativa, Rho Spearman, $p < 0,05$.

Tabla 32. Parámetros evaluados en los grupos de caballos con fertilidad alta y baja.

Tipo de muestra Grupo de caballos con	Semen fresco		Semen congelado	
	Fertilidad alta	Fertilidad baja	Fertilidad alta	Fertilidad baja
Motilidad (%)	42,69±6,20*	14,00±2,65*	34,56±6,14*	8,5714±2,15*
Nº total de espermatozoides (x10 ⁹)	5,94±1,39**	1,02±0,72**	5,94±1,39**	1,02±0,72**
Morfología normal (%)	47,63±9,09**	30,29±4,07**	39,69±7,42**	23,57±4,39**
Anchura del escroto (cm)	9,56±0,21	9,41±0,24	-	-
HOST test positivos (%)	54,94±4,64*	27,00±4,32*	37,38±3,52*	17,00±3,96*
Tasa de embarazo	76,94±5,30**	60,00±5,42**	-	-
Nº de servicios por embarazo	2,00±0,52*	4,71±1,11*	-	-
Índice de fragmentación	-	-	7,47±4,41*	32±10,58*

* Las diferencias son significativas, U Mann Whitney, $p < 0,05$.

** Las diferencias son significativas, ANOVA, $p < 0,05$.

Se comparan las muestras de semen fresco de caballos de fertilidad alta con las de semen fresco de caballos de fertilidad baja y las muestras de semen congelado de caballos de fertilidad alta con las de semen congelado de caballos de fertilidad baja.

Tabla 33. Índice de fragmentación de ADN calculado mediante SCD en cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 34. Índice de fragmentación de cadena sencilla (DFI ss) de las muestras de semen analizadas tratadas de manera independiente con concentraciones crecientes de H₂O₂.

GRUPO	DFI (%)
Control 1	6,40±1,30
Vacunados 1	63,42±3,35*
Vacunados 2	21,72±4,22*
Control 2	5,71±0,75

Los valores son la media \pm error estándar.

* El grupo es significativamente distinto del control, ANOVA, $p < 0,05$.

	Individual	Control	0.003 H ₂ O ₂	0.03 H ₂ O ₂	0.3 H ₂ O ₂
<i>Mus musculus</i>	1	20,3	21,2	35,6	80,5
	2	16,4	17	31,2	82,6
<i>Homo sapiens</i>	1	15	13,6	55,1	95,7
	2	14,3	15,3	60,9	98,7
<i>Sus domesticus</i>	1	3,5	3,9	5,7	30,2
	2	5	4,6	6,9	43,1
<i>Phascolarctos cinereus</i>	1	60,4	92,6	100	100
	2	52	96,1	100	100
<i>Macropus giganteus</i>	1	34,7	79,1	93	100
	2	41	82,3	100	100
<i>Vombatus ursinus</i>	1	49,2	84,9	100	100
	2	51	92	100	100

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Acharyya, S., Kanjilal, S. y Bhattacharyya, A. K. (2005). Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian Journal of Experimental Biology* 43, 1016-22.

Adham, I. M., Nayernia, K., Burkhardt-Gottges, E., Topaloglu, O., Dixkens, C., Holstein, A. F. y Engel, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Molecular Human Reproduction* 7, 513-20.

Agarwal, A. y Allamaneni, S. S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecologica* 56, 235-45.

Agarwal, A. y Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 9, 331-45.

Agarwal, A., Saleh, R. A. y Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79, 829-43.

Ahmadi, A. y Ng, S. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 284, 696-704.

Aitken, J. y Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16, 259-67.

Aitken, R. y Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.

Aitken, R. J. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* 115, 1-7.

Aitken, R. J. (2004). Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reproduction, Fertility and Development* 16, 655-64.

Aitken, R. J., Baker, M. A. y Sawyer, D. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online* 7, 65-70.

Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z. y Irvine, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59, 1037-46.

Akama, K., Sato, H., Hasegawa, S., Shimada, I. y Nakano, M. (1998). Transition protein 1 from boar late spermatid nuclei having DNA-melting activity is a dimeric protein. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44, 315-23.

Akama, K., Sato, H., Oguma, K. y Nakano, M. (1997). Isolation of intact transition protein 2 with three zinc finger motifs from boar late spermatid nuclei. *Biochemistry and Molecular Biology International* 42, 865-72.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science.

Allamaneni, S. S., Naughton, C. K., Sharma, R. K., Thomas, A. J., Jr. y Agarwal, A. (2004). Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertility and Sterility* 82, 1684-6.

Allen, M. J., Lee, C., Lee, J. D. t., Pogany, G. C., Balooch, M., Siekhaus, W. J. y Balhorn, R. (1993). Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. *Chromosoma* 102, 623-30.

Anderson, M. y Makinen, A. (2000). The hereditary 'short tail' sperm defect in Yorkshire boars. An animal model for diagnosis of human carriers of homologous sperm defect. *International Journal of Andrology* 3, 34.

Aoki, V. W., Liu, L., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Gibson, M., Peterson, C. M. y Carrell, D. T. (2006). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to *in vitro* fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility* 86, 1408-15.

Auger, J., Mesbah, M., Huber, C. y Dadoune, J. P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International Journal of Andrology* 13, 452-62.

Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.

Baarends, W. M., van der Laan, R. y Grootegoed, J. A. (2000). Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation* 23, 597-604.

Baccetti, B., Burrini, A. G., Collodel, G., Magnano, A. R., Piomboni, P., Renieri, T. y Sensini, C. (1989). Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Research* 23, 181-8.

Baccetti, B., Burrini, A. G., Collodel, G., Piomboni, P. y Renieri, T. (1991). A "miniacrosome" sperm defect causing infertility in two brothers. *Journal of Andrology* 12, 104-11.

Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E. y Piomboni, P. (2001). Genetic sperm defects and consanguinity. *Human Reproduction* 16, 1365-71.

Bak, A. L., Zeuthen, J. y Crick, F. H. (1977). Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 1595-9.

Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* 93, 298-305.

Balhorn, R. (1989). Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In *Molecular Biology of Chromosome Function*, (ed. K. W. Adolph). New York: Springer-Verlag.

Balhorn, R., Corzett, M., Mazrimas, J. y Watkins, B. (1991). Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30, 175-81.

- Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C. y Wyrobek, A. J. (1984). DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Experimental Cell Research* 150, 298-308.
- Ballachey, B. E., Evenson, D. P. y Saacke, R. G. (1988). The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of Andrology* 9, 109-15.
- Ballachey, B. E., Hohenboken, W. D. y Evenson, D. P. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biology of Reproduction* 36, 915-25.
- Ballachey, B. E., Miller, H. L., Jost, L. K. y Evenson, D. P. (1986). Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol. *Journal of Animal Science* 63, 995-1004.
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S. y Saunders, P. T. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129, 505-14.
- Barbieri, E. R., Hidalgo, M. E., Venegas, A., Smith, R. y Lissi, E. A. (1999). Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *Journal of Andrology* 20, 713-7.
- Barroso, G., Morshedi, M. y Oehninger, S. (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 15, 1338-44.
- Barth, A. D. y Oko, R. J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, Iowa: Iowa University Press.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J. y Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology* 24, 621-8.

Bedford, J. M. (1975). Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis, en *Handbook of Physiology*, volumen 5. Ed. Greep, R. O. y Hamilton, D. W. Washington DC: American Physiological Society.

Bedford, J. M. (1979). Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis, en *The Spermatozoon* (7-21), Ed. Fawcett, D. W. y Bedford, J. M.). Baltimore: Urban & Schwarzenberg.

Bedford, J. M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction* 28, 108-20.

Bedford, J. M. (1991). *The coevolution of mammalian gametes*. New York: A Plenum Press.

Bedford, J. M. (1998). Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biology of Reproduction* 59, 1275-87.

Bedford, J. M. y Breed, W. G. (1994). Regulated storage and subsequent transformation of spermatozoa in the fallopian tubes of an Australian marsupial, *Sminthopsis crassicaudata*. *Biology of Reproduction* 50, 845-54.

Bedford, J.M. y Calvin, H. I. (1974a). Changes in S-S cross linked structure of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observations in submammalian species. *Journal of Experimental Zoology* 187, 181-204.

Bedford, J. M. y Calvin, H. I. (1974b). The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology* 188, 137-55.

Bellve, A. R., Anderson, E. y Hanley Bowdoin, L. (1975). Synthesis and amino acid composition of basic proteins in mammalian sperm nuclei. *Dev Biol* 47, 349-65.

Benchai, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, S., Lejeune, H. y Guerin, J. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction* 18, 1023-8.

Benchai, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B. y Francois Guerin, J. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility* 87, 93-100.

Bennetts, L. E. y Aitken, R. J. (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 71, 77-87.

Benoff, S. y Gilbert, B. R. (2001). Varicocele and male infertility: part I. Preface. *Human Reproduction Update* 7, 47-54.

Benoff, S. H., Millan, C., Hurley, I. R., Napolitano, B. y Marmar, J. L. (2004). Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Human Reproduction* 19, 616-27.

Bianchi, P. G., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Bianchi, U. y Sakkas, D. (1993). Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biology of Reproduction* 49, 1083-8.

Billig, H., Chun, S., Eisenhauer, K. y Hsueh, A. (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human Reproduction Update* 2, 103-17.

Bloch, D. P. (1969). A catalog of sperm histones. *Genetics*, Suplemento 61, 93-111.

Bloch, D. P. (1976). Histones of sperm, en *Handbook of Genetics*, volumen 5 (139-49). Ed. King, R. C. Nueva York: Plenum Press.

Blom, E. (1973). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. *Nordisk Veterinaermedicin* 25, 383-91.

- Blom, E.** (1976). A sterilizing tail stump sperm defect in a Holstein-Friesian bull. *Nordisk Veterinaermedicin* 28, 295-8.
- Bochenek, M., Smorag, Z. y Pilch, J.** (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology* 56, 557-67.
- Boe-Hansen, G. B., Christensen, P., Vibjerg, D., Nielsen, M. B. y Hedeboe, A. M.** (2008). Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology* 69, 728-36.
- Boe-Hansen, G. B., Ersboll, A. K., Greve, T. y Christensen, P.** (2005). Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006-19.
- Boe-Hansen, G. B., Fedder, J., Ersboll, A. K. y Christensen, P.** (2006). The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 21, 1576-82.
- Boissonneault, G.** (2002). Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Letters* 514, 111-4.
- Bonde, J. P., Ernst, E., Jensen, T. K., Hjollund, N. H., Kolstad, H., Henriksen, T. B., Scheike, T., Giwercman, A., Olsen, J. y Skakkebaek, N. E.** (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352, 1172-7.
- Bonnet, C. y Spallanzani, L.** (1773). *Contemplazione della natura*. Venecia.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C. y Coticchio, G.** (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction* 21, 2876-81.
- Braude, P., Bolton, V. y Moore, S.** (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332, 459-61.
- Braun, R. E.** (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics* 28, 10-2.

Breed, W. G., Leigh, C. M. y Ricci, M. (2001). The structural organisation of sperm head components of the wombat and koala (suborder: Vombatiformes): an enigma amongst marsupials. *Journal of Anatomy* 198, 57-66.

Breucker, H., Schafer, E. y Holstein, A. F. (1985). Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell and Tissue Research* 240, 303-9.

Brewer, L., Corzett, M., Lau, E. Y. y Balhorn, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42403-8.

Brewer, L. R., Corzett, M. y Balhorn, R. (1999). Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286, 120-3.

Brinkworth, M. H. (2000). Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *International Journal of Andrology* 23, 123-35.

Briskie, J. V. y Montgomerie, R. (1992). Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 247, 89-95.

Brooks, J. E. (1987). Properties and uses of restriction endonucleases. *Methods in Enzymology* 152, 113-29.

Bryant, P. E. (1984). Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam H1: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine* 46, 57-65.

Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. y Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction* 22, 174-9.

Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M. T. y Marilley, M. (1982). A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature* 298, 100-2.

Bustillo, M. y Rajfer, J. (1986). Pregnancy following insemination with sperm aspirated directly from vas deferens. *Fertility and Sterility* 46, 144-6.

Calogero, A. E., De Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Romeo, R., Rappazzo, G. y D'Agata, R. (2001). Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Human Reproduction* 16, 1172-9.

Calvin, H. I. (1976). Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 434, 377-89.

Calvin, H. I. y Bedford, J. M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suplemento 13, 65-75.

Cardullo, R. A. y Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 19, 180-8.

Carlsen, E., Andersson, A. M., Petersen, J. H. y Skakkebaek, N. E. (2003). History of febrile illness and variation in semen quality. *Human Reproduction* 18, 2089-92.

Caron, N., Veilleux, S. y Boissonneault, G. (2001a). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Molecular Reproduction and Development* 58, 437-43.

Caron, N., Veilleux, S., Chabot, M. y Boissonneault, G. (2001b). *Andrology in the 21st Century*. Montreal: Medimond.

Carrell, D. T., Liu, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Erickson, L. y Campbell, B. (2003a). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Archives of Andrology* 49, 49-55.

Carrell, D. T., Wilcox, A. L., Lowy, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Erickson, L., Campbell, B., Branch, D. W. y Hatasaka, H. H. (2003b). Elevated sperm chromosome aneuploidy and

apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstetrics & Gynecology* 101, 1229-35.

Cataldo, L., Baig, K., Oko, R., Mastrangelo, M. A. y Kleene, K. C. (1996). Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Molecular Reproduction and Development* 45, 320-31.

Celik-Ozenci, C., Jakab, A., Kovacs, T., Catalanotti, J., Demir, R., Bray-Ward, P., Ward, D. y Huszar, G. (2004). Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction* 19, 2052-9.

Cerná, A., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Moreno Díaz de la Espina, S., de la Torre, C. y Gosálvez, J. (2008). Triplex configuration in the nick-free DNAs that constitute the chromosomal scaffolds in grasshopper spermatids. *Chromosoma* 117, 15-24.

Clermont, Y. y Bustos-Obregon, E. (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *The American Journal of Anatomy* 122, 237-47.

Coelingh, J. P., Monfoort, C. H., Rozijn, T. H., Leuven, J. A., Schiphof, R., Steyn-Parve, E. P., Braunitzer, G., Schrank, B. y Ruhfus, A. (1972). The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 285, 1-14.

Coelingh, J. P., Rozijn, T. H. y Monfoort, C. H. (1969). Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochimica et Biophysica Acta* 188, 353-6.

Cole, K. D. y Kistler, W. S. (1987). Nuclear transition protein 2 (TP2) of mammalian spermatids has a very basic carboxyl terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 147, 437-42.

Colenbrander, B., Gadella, B. M. y Stout, T. A. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 305-11.

Colombero, L. T., Hariprashad, J. J., Tsai, M. C., Rosenwaks, Z. y Palermo, G. D. (1999). Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome. *Fertility and Sterility* 72, 90-6.

Collins, A. R. (2002). The Comet Assay: Principles, Applications and Limitations, en *In Situ Detection of DNA Damage. Methods and Protocols* volumen 203. Ed. Didenko, V. V. Humana Press.

Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G. y Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 375, 183-93.

Collins, J. A., Barnhart, K. T. y Schlegel, P. N. (2008). Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with *in vitro* fertilization? *Fertility and Sterility* 89, 823-31.

Comhaire, F. (1991). The pathogenesis of epididymo-testicular dysfunction in varicocele: factors other than temperature. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 286, 281-7.

Cook, P. R., Brazell, I. A. y Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science* 22, 303-24.

Cooper, T. G. y Yeung, C. H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy Research and Technique* 61, 28-38.

Cortés, J. L., Ligeró, G., Sánchez, L., Nieto, A., Bueno, C., Montes, R. y Menéndez, P. (2008). Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos. *ASEBIR* 14, 6-13.

Cortés-Gutiérrez, E., Dávila-Rodríguez, M., López-Fernández, C., Fernández, J.L. y Gosálvez, J. (2008). Alkali-labile sites in sperm cells from *Sus* and *Ovis* species. *International Journal of Andrology* 31, 354-63.

- Courot, M., Hochereau-de Reviers, M. T. y Ortavant, R.** (1970). Spermatogenesis, en *The Testis* volumen 1. (339-432). Ed. Johnson AD, Gomes WR y Vandemark NL). New York: Academic Press.
- Cristanelli, M. J., Squires, E. L., Amann, R. P. y Pickett, B. W.** (1984). Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 22, 39-45.
- Cross, N. L.** (2003). Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of Reproduction* 69, 529-34.
- Cummins, J. M.** (1980). Decondensation of sperm nuclei of australian marsupials: Effects of air drying and of calcium and magnesium. *Gamete Research* 3, 351-367.
- Cummins, J. M. y Woodall, P. F.** (1985). On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 153-75.
- Cunningham, J. G.** (2005). *Fisiología Veterinaria*. Madrid: Elsevier España.
- Chandler, J. E. y Adkinson, R. W.** (1990). Genetic and non-genetic contributions to variation in spermatozoal morphology of mature Holstein bulls. *Proceeding of the NAAB 13th Technical Conference on AI and Reprod*, 57-62.
- Chemes, H. E., Puigdomenech, E. T., Carizza, C., Olmedo, S. B., Zanchetti, F. y Hermes, R.** (1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Human Reproduction* 14, 1811-8.
- Chen, C., Lee, S., Chen, D., Chien, H., Che, I., Chu, Y., Liu, J., Chen, W. y Wu, G.** (2004). Apoptosis and Kinematics of Ejaculated Spermatozoa in Patients With Varicocele. *Journal of Andrology* 25, 348-53.
- Chen, H. Y., Sun, J. M., Zhang, Y., Davie, J. R. y Meistrich, M. L.** (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13165-9.
- Chenoweth, P. J.** (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64, 457-68.

Chew, S. L., Baginsky, L. y Eperon, I. C. (2000). An exonic splicing silencer in the testes-specific DNA ligase III beta exon. *Nucleic Acids Research* 28, 402-10.

Chirat, F., Martinage, A., Briand, G., Kouach, M., Van Dorsselaer, A., Loir, M. y Sautiere, P. (1991). Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants. *European Journal of Biochemistry* 198, 13-20.

Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W. D., Goulding, E. H., Stein, P., Xu, Z., Schultz, R. M., Hecht, N. B. y Eddy, E. M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of Reproduction* 69, 211-7.

Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J. y Carrell, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* 27, 53-9.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Nelson, J. K. y Benfield, D. A. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *American Journal of Veterinary Research* 58, 40-5.

Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* 61, 56-75.

Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. y Melamed, M. R. (1975). Thermal denaturation of DNA *in situ* as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Experimental Cell Research* 90, 411-28.

Das, R. K. y Nayak, R. (1988). Spermatocyte chromosome alterations in mice inoculated with antirabies vaccine and tetanus toxoid separately and in combination. *Mutation Research* 204, 277-82.

Davidson, H. A. (1954). Treatment of male subfertility; testicular temperature and varicoceles. *Practitioner* 173, 703-8.

De Jonge, C. (2002). The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Human Fertility* 5, 51-3.

De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* 11, 205-14.

De Jonge, C. y Barratt, C. L. R. (2006). The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge: Cambridge University Press.

De la Rochebrochard, E. y Thonneau, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction* 17, 1649-56.

De la Torre, J., Lopez-Fernández, C., Pita, M., Fernández, J. L., Johnston, S. D. y Gosálvez, J. (2007). Simultaneous observation of DNA fragmentation and protein loss in the boar spermatozoon following application of the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Journal of Andrology* 28, 533-40.

De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology & Medicine* 14, 157-66.

De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*, Suplemento 10, 15-21.

De Lucia, F., Faraone-Mennella, M. R., D'Erme, M., Quesada, P., Caiafa, P. y Farina, B. (1994). Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198, 32-9.

De Rycke, M., Liebaers, I. y Van Steirteghem, A. (2002). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Human Reproduction* 17, 2487-94.

- Dijkwel, P. A., Wenink, P. W. y Poddighe, J. (1986). Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. *Nucleic Acids Research* 14, 3241-9.
- Dobrinski, I., Hughes, H. P. y Barth, A. D. (1994). Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 531-8.
- Dowsett, K. F. y Pattie, W. A. (1982). Characteristics and fertility of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suplemento 32, 1-8.
- Drevius, L. O. y Eriksson, H. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42, 136-56.
- Drobnis, E. Z., Yudin, A. I., Cherr, G. N. y Katz, D. F. (1988). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Developmental Biology* 130, 311-23.
- Duran, E. H., Morshedi, M., Taylor, S. y Oehninger, S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 17, 3122-8.
- Dybas, L. K. y Dybas, H. S. (1981). Coadaptation and Taxonomic Differentiation of Sperm and Spermathecae in Featherwing Beetles. *Evolution* 35, 168-74.
- Eddy, E. M., Judy, M. C., Daniel, G. y Bruce, A. F. (1981). Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Research* 4, 333-62.
- Enciso, M., Muriel, L., Fernández, J. L., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M., Montejo, J. M., Ardoy, M., Pacheco, A. y Gosálvez, J. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of Andrology* 27, 106-11.
- Esponda, P. (1985). Spermiogenesis and spermatozoa in mammals. *Revisiones sobre Biología Celular* 6, 1-99.

Estop, A. M., Munne, S., Jost, L. K. y Evenson, D. P. (1993). Studies on sperm chromatin structure alterations and cytogenetic damage of mouse sperm following *in vitro* incubation. Studies on *in vitro*-incubated mouse sperm. *Journal of Andrology* 14, 282-8.

Evenson, D. y Jost, L. (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods in Cell Biology* 42, 159-76.

Evenson, D., Jost, L., Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, G., Purvis, K., de Angelis, P. y Claussen, O. (1999). Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14, 1039-49.

Evenson, D. P. (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reproduction, Fertility and Development* 11, 1-15.

Evenson, D. P., Baer, R. K. y Jost, L. K. (1989). Flow cytometric analysis of rodent epididymal spermatozoal chromatin condensation and loss of free sulfhydryl groups. *Molecular Reproduction and Development* 1, 283-8.

Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. y Melamed, M. R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-3.

Evenson, D. P., Jost, L. K., Corzett, M. y Balhorn, R. (2000). Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 21, 739-46.

Evenson, D. P., Larson, K. L. y Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25-43.

Evenson, D. P., Thompson, L. y Jost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637-51.

Evenson, D. P. y Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-91.

Evenson, D. P. y Wixon, R. (2008). Data analysis of two *in vivo* fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility and Sterility* 90, 1229-31.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L. y O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37-59.

Falls, J. G., Pulford, D. J., Wylie, A. A. y Jirtle, R. L. (1999). Genomic imprinting: implications for human disease. *American Journal of Pathology* 154, 635-47.

Fawcett, D. W. y Phillips, D. M. (1969). The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anatomical Record* 165, 153-64.

Felsenfeld, G. (1978). Chromatin. *Nature* 271, 115-22.

Fernández, J. y Gosálvez, J. (2002). Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH(DBD-FISH). *Methods in Molecular Biology* 203, 203-216.

Fernández, J., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vazquez, R., y Álvarez, J. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 24, 59-66

Fernández, J. L., Goyanes, V. J., Ramiro-Díaz, J. y Gosálvez, J. (1998). Application of FISH for *in situ* detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenetics and Cell Genetics* 82, 251-6.

Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M. y De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* 84, 833-42.

Fernández, J. L., Vazquez-Gundin, F., Delgado, A., Goyanes, V. J., Ramiro-Díaz, J., de la Torre, J. y Gosálvez, J. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutation Research* 453, 77-82.

Fernández, J. L., Vazquez-Gundin, F., Rivero, M. T., Genesca, A., Gosálvez, J. y Goyanes, V. (2001). DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells. *Experimental Cell Research* 270, 102-9.

Feuchter, F. A., Vernon, R. B. y Eddy, E. M. (1981). Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biology of Reproduction* 24, 1099-110.

Feughelman, M., Langridge, R., Seeds, W. E., Stokes, A. R., Wilson, H. R., Hooper, C. W., Wilkins, M. H., Barclay, R. K. y Hamilton, L. D. (1955). Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. *Nature* 175, 834-8.

Fey, E. G. y Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 121-5.

Finch, J. T. y Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1897-901.

Fischer, M. A., Willis, J. y Zini, A. (2003). Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* 61, 207-11.

Flickinger, R. A., Givens, R., Pine, S. y Sepanik, P. (1986). Factors controlling the size of DNA loops in frog embryos and Friend erythroleukemia cells. *Cell Differ* 19, 59-71.

Fossa, S. D., De Angelis, P., Kraggerud, S. M., Evenson, D., Theodorsen, L. y Clausen, O. P. (1997). Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 30, 192-6.

Franken, D. R., Franken, C. J., de la Guerre, H. y de Villiers, A. (1999). Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 31, 361-6.

Frankenhuis, M. T. y Wensing, C. J. (1979). Induction of spermatogenesis in the naturally cryptorchid pig. *Fertility and Sterility* 31, 428-33.

Fraser, L. (2004). Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7, 311-21.

Fraser, L. y Strzezek, J. (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42, 49-55.

Fraser, L. y Strzezek, J. (2005). Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 530-6.

Frydman, N., Prisant, N., Hesters, L., Frydman, R., Tachdjian, G., Cohen-Bacrie, P. y Fanchin, R. (2008). Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 89, 92-7.

Fukui, N. (1923). Action of body temperature on the testicle. *Japan Medical World*.

Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1, 17-27.

Gage, M. J. (1998). Mammalian sperm morphometry. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 265, 97-103.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leter, G., Ciriminna, R., Culasso, F., Dondero, F., Lenzi, A. y col. (2004). Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction* 19, 1409-17.

Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119, 493-501.

Gerton, G. L. (2002). *Function of the sperm acrosome en Fertilization*. San Diego: Academic Press.

Getzenberg, R. H., Pienta, K. J. y Coffey, D. S. (1990). The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocrine Reviews* 11, 399-417.

Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., Jr. y Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* 16, 1922-30.

Gillan, L., Evans, G. y Maxwell, W. M. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445-57.

Givens, M. D. (2006). A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology* 66, 648-54.

Givens, M. D. y Waldrop, J. G. (2004). Bovine viral diarrhea virus in embryo and semen production systems. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20, 21-38.

Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J. P., Jepson, K., Frohm, B. y Spano, M. (2003). Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and Sterility* 80, 1404-12.

Goldberg, R. B., Geremia, R. y Bruce, W. R. (1977). Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse. *Differentiation* 7, 167-80.

Goldstein, M. y Eid, J. F. (1989). Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *The Journal of Urology* 142, 743-5.

Gomendio, M. y Roldan, E. R. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 243, 181-5.

- Gomendio, M. y Roldan, E. R.** (1993). Coevolution between male ejaculates and female reproductive biology in eutherian mammals. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 252, 7-12.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H. y Darzynkiewicz, Z.** (1993a). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research* 207, 202-5.
- Gorczyca, W., Gong, J. y Darzynkiewicz, Z.** (1993b). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* 53, 945-951.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, & Johnston SD.** (2009). Mapping alkali-labile sites in mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction: New Research Developments*. Hauppauge, Nueva York: Nova Science Publishers, Inc.
- Gosden, R., Trasler, J., Lucifero, D. y Faddy, M.** (2003). Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 361, 1975-7.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. y Khochbin, S.** (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry* 271, 3459-69.
- Graham, E. F., Crabo, B. G. y Brown, K. I.** (1972). Effect of Some Zwitter Ion Buffers on the Freezing and Storage of Spermatozoa I. Bull. *Journal of Dairy Science* 55, 372.
- Green, D. P.** (1988). Sperm thrusts and the problem of penetration. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 63, 79-105.
- Greve, J. M. y Wassarman, P. M.** (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *Journal of Molecular Biology* 181, 253-64.

Guraya, S. S. (1995). The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *International Review of Cytology* 160, 163-220.

Guttenbach, M. y Schmid, M. (1990). Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive *in situ* hybridization. *The American Journal of Human Genetics* 46, 553-8.

Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A. y col. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England Journal of Medicine* 345, 1388-93.

Haaf, T., Grunenberg, H. y Schmid, M. (1990). Paired arrangement of nonhomologous centromeres during vertebrate spermiogenesis. *Experimental Cell Research* 187, 157-61.

Hafez, E. S. E. (1996). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Nueva Editorial Interamericana.

Hafez, E. S. E. y Hafez, B. (2000). *Reproduction in farm animals*. Baltimore, Maryland: Wiley.

Haidl, G. (1994). Epididymal maturation of human spermatozoa. *Fortschritte der Medizin* 112, 492-5.

Hales, B. F. y Robaire, B. (2001). Paternal exposure to drugs and environmental chemicals: effects on progeny outcome. *Journal of Andrology* 22, 927-36.

Harrison, R. y Weiner, J. (1948). Abdomino-testicular temperature gradients. *The Journal of Physiology* 18, 256-262.

Harrison, R. A. y Gadella, B. M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-51.

Hartsoeker, N. (1694). *Essai de dioptrique*. Paris: J. Anisson.

Hauser, R., Paz, G., Botchan, A., Yogev, L. y Yavetz, H. (2001). Varicocele: effect on sperm functions. *Human Reproduction Update* 7, 482-5.

Heath, E. y Ott, R. S. (1982). Diadem/crater defect in spermatozoa of a bull. *The Veterinary Record* 110, 5-6.

Heller, C. G. y Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 140, 184-6.

Hendin, B. N., Falcone, T., Hallak, J., Nelson, D. R., Vemullapalli, S., Goldberg, J., Thomas, A. J., Jr. y Agarwal, A. (2000). The effect of patient and semen characteristics on live birth rates following intrauterine insemination: a retrospective study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17, 245-52.

Hendin, B. N., Kolettis, P. N., Sharma, R. K., Thomas, A. J., Jr. y Agarwal, A. (1999). Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *The Journal of Urology* 161, 1831-4.

Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W. B. y Kruger, T. F. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* 81, 965-72.

Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W. B. y Kruger, T. F. (2003). DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive Biomedicine Online* 7, 477-84.

Hertwig, O. (1876). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morphol Jahr* 1, 347-452.

Hirsh, A. V., Mills, C., Tan, S. L., Bekir, J. y Rainsbury, P. (1993). Pregnancy using spermatozoa aspirated from the vas deferens in a patient with ejaculatory failure due to spinal injury. *Human Reproduction* 8, 89-90.

- Hirth, H. F. (1960). The spermatozoa of some North American bats and rodents. *Journal of Morphology* 106, 77-83.
- Ho, H. C. y Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of Reproduction* 68, 1590-6.
- Holstein, A. F. y Roosen-Runge, E. C. (1985). Atlas of human spermatogenesis. Berlin: Groose Verlag Cm H
- Host, E., Ernst, E., Lindenberg, S. y Smidt-Jensen, S. (2001). Morphology of spermatozoa used in IVF and ICSI from oligozoospermic men. *Reproductive Biomedicine Online* 3, 212-5.
- Host, E., Lindenberg, S., Kahn, J. A. y Christensen, F. (1999). DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 78, 336-9.
- Host, E., Lindenberg, S. y Smidt-Jensen, S. (2000). The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 79, 559-63.
- Huang, C. C., Lin, D. P., Tsao, H. M., Cheng, T. C., Liu, C. H. y Lee, M. S. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 84, 130-40.
- Huang, T. T., Kosower, N. S. y Yanagimachi, R. (1984). Localization of thiol and disulfide groups in guinea pig spermatozoa during maturation and capacitation using bimeane fluorescent labels. *Biology of Reproduction* 31, 797-809.
- Hud, N. V., Allen, M. J., Downing, K. H., Lee, J. y Balhorn, R. (1993). Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193, 1347-54.
- Hughes, R. L. (1977). Light and electron microscope studies on the spermatozoa of the koala, *Phascolarctos cinereus* (Marsupialia). *Journal of Anatomy* 124, 513.

Hydén-Granskog, C., Unkila-Kallio, L., Halttunen, M. y Tiitinen, A. (2005). Single embryo transfer is an option in frozen embryo transfer *Human Reproduction* 20, 2935-8.

Hyodo, M. y Flickinger, R. A. (1973). Replicon growth rates during DNA replication in developing frog embryos. *Biochimica et Biophysica Acta* 299, 24-33.

Inoue, M. y Wolf, D. P. (1974). Solubility properties of the murine zona pellucida. *Biology of Reproduction* 10, 512-8.

Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A. y Aitken, R. J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21, 33-44.

Ivell, R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5, 15.

Januskauskas, A., Johannisson, A. y Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743-58.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L. y Rodriguez-Martinez, H. (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859-75.

Jason, L. J., Moore, S. C., Lewis, J. D., Lindsey, G. y Ausio, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24, 166-74.

Jenuwein, T. y Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80.

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. y Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70, 219-28.

Johnson, G. D. y Nogueira, A. G. M. (1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *Journal of immunological methods* 43, 349-50.

Jones, R. (2004). Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. *Biology of Reproduction* 71, 1405-11.

Kaneko, T., Whittingham, D. G., Overstreet, J. W. y Yanagimachi, R. (2003). Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biology of Reproduction* 69, 1859-62.

Karabinus, D. S., Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K. y Kaproth, M. T. (1990). Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *Journal of Dairy Science* 73, 2364-71.

Karabinus, D. S. y Gelety, T. J. (1997). The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertility and Sterility* 67, 536-41.

Kasinsky, H. E. (1989). Specificity and distribution of sperm basic proteins, en *Histones and other basic nuclear proteins*. Ed. Hnilica, L. S., Stein, G. y Stein J. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Katz, P., Nachtigall, R. y Showstack, J. (2002). The economic impact of the assisted reproductive technologies. *Nature Cell Biology*, Suplemento 4, s29-32.

Kawashima, S. y Ando, T. (1978). Deoxyribonucleoproteins of herring sperm nuclei. I. Chemical composition. *The Journal of Biochemistry* 83, 1117-23.

Keichline, L. D. y Wassarman, P. M. (1979). Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm, and adult somatic cells. *Biochemistry* 18, 214-9.

Kenney, R. M., Evenson, D. P., Garcia, M. C. y Love, C. C. (1995). *Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate*. Place Madison: Society for the Study of Reproduction.

Kenney, R. M., Hurtgen, J. P., Pierson, R., Witherspoon, D. y Simons, J. (1983). Clinical fertility evaluation of the stallion. *Journal of Society for Theriogenology* 9, 7-62.

Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-57.

Khadake, J. R. y Rao, M. R. (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* 34, 15792-801.

Khalil, M. R., Rasmussen, P. E., Erb, K., Laursen, S. B., Rex, S. y Westergaard, L. G. (2001). Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 80, 74-81.

Khalili, M. A., Aghaie-Maybodi, F., Anvari, M. y Talebi, A. R. (2006). Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urology Journal* 3, 154-9.

Khanna, K. K. y Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27, 247-54.

Kharchenko, E. P. y Nalivaeva, N. N. (1979). Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 15, 410-16.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259-72.

Kierszenbaum, A. L. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Molecular Reproduction and Development* 58, 357-8.

Kistler, W. S., Keim, P. S. y Heinrichson, R. L. (1976). Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 427, 752-7.

Kistler, W. S., Noyes, C., Hsu, R. y Heinrichson, R. L. (1975). The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 250, 1847-53.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. y Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: mechanism and technical considerations. *Mutation Research* 363, 89-96.

Kleene, K. C., Borzorgzadeh, A., Flynn, J. F., Yelick, P. C. y Hecht, N. B. (1988). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse transition protein 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 950, 215-20.

Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H. y Tanaka, T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* 68, 519-24.

Koehler, J. K., Würschmidt, U. y Larsen, M. P. (1983). Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa. *Gamete Research* 8, 357-70.

Kort, H. I., Massey, J. B., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D. B., Witt, M. A. y Roudebush, W. E. (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of Andrology* 27, 450-2.

Kosower, N. S., Katayose, H. y Yanagimachi, R. (1992). Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *Journal of Andrology* 13, 342-8.

Kovalski, N. N., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertility and Sterility* 58, 809-16.

Kovanci, E., Kovacs, T., Moretti, E., Vigue, L., Bray-Ward, P., Ward, D. C. y Huszar, G. (2001). FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Human Reproduction* 16, 1209-17.

Kremling, H., Luerssen, H., Adham, I. M., Klemm, U., Tsaousidou, S. y Engel, W. (1989). Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals. *Differentiation* 40, 184-90.

- Kubo-Irie, M., Matsumiya, K., Iwamoto, T., Kaneko, S. y Ishijima, S. (2005). Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. *Molecular Reproduction and Development* 70, 70-81.
- Kundu, T. K. y Rao, M. R. (1996). Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry* 35, 15626-32.
- Kusakabe, H., Szczygiel, M. A., Whittingham, D. G. y Yanagimachi, R. (2001). Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13501-6.
- Larsen, R. E. y Chenoweth, P. J. (1990). Diadem/crater defects in spermatozoa from two related angus bulls. *Molecular Reproduction and Development* 25, 87-96.
- Larson-Cook, K. L., Brannian, J. D., Hansen, K. A., Kasperson, K. M., Aamold, E. T. y Evenson, D. P. (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility* 80, 895-902.
- Larson, K. L., De Jonge, C. J., Barnes, A. M., Jost, L. K. y Evenson, D. P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* 15, 1717-1722.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25, 888-96.
- Leal, M. C. y Franca, L. R. (2006). The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of Reproduction* 74, 616-24.
- Leblond, C. P. y Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *The American Journal of Anatomy* 90, 167-215.

Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L. y Wolf, J. P. (2005). Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynecology, Obstetrique & Fertilité* 33, 2-10.

Levesque, D., Veilleux, S., Caron, N. y Boissonneault, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252, 602-9.

Levitan, D. R. (2000). Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 267, 531-4.

Lewis-Jones, I., Aziz, N., Seshadri, S., Douglas, A. y Howard, P. (2003). Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertility and Sterility* 79, 212-5.

Lewis, J. D., Abbott, D. W. y Ausio, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology* 81, 131-40.

Lewis, S. E., O'Connell, M., Stevenson, M., Thompson-Cree, L. y McClure, N. (2004). An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Human Reproduction* 19, 1385-94.

Lilley, D. M. y Pardon, J. F. (1979). Structure and function of chromatin. *Annual Review of Genetics* 13, 197-233.

Lim, A. S. y Tsakok, M. F. (1997). Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertility and Sterility* 68, 265-71.

Lin, M. H., Kuo-Kuang Lee, R., Li, S. H., Lu, C. H., Sun, F. J. y Hwu, Y. M. (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility* 90, 352-9.

Linfor, J. J. y Meyers, S. A. (2002). Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *Journal of Andrology* 23, 107-13.

Loft, S., Kold-Jensen, T., Hjollund, N. H., Giwercman, A., Gyllemborg, J., Ernst, E., Olsen, J., Scheike, T., Poulsen, H. E. y Bonde, J. P. (2003). Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Human Reproduction* 18, 1265-72.

Loir, M. y Lanneau, M. (1975). An electrophoretic analysis of the basic nuclear proteins of ram spermatids. *Experimental Cell Research* 92, 509-12.

Loir, M. y Lanneau, M. (1978). Transformation of ram spermatid chromatin. *Experimental Cell Research* 115, 231-43.

Longo, F. J., Krohne, G. y Franke, W. W. (1987). Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *The Journal of Cell Biology* 105, 1105-20.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G. y Casper, R. F. (1998a). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13, 896-900.

Lopes, S., Sun, J. G., Jurisicova, A., Meriano, J. y Casper, R. F. (1998b). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 69, 528-32.

Lopez-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J. L., Arana, P., Johnston, S. D. y Gosalvez, J. (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-50.

Lopez-Fernández, C., Fernández, J. L., Gosalbez, A., Arroyo, F., Vazquez, J. M., Holt, W. V. y Gosalvez, J. (2008a). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology* 70, 898-908.

Lopez-Fernández, C., Perez-Llano, B., Garcia-Casado, P., Sala, R., Gosalbez, A., Arroyo, F., Fernández, J. L. y Gosalvez, J. (2008b). Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science* 103, 87-98.

Love, C. C. (2005). The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Animal Reproduction Science* 89, 39-45.

Love, C. C., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Thompson, J. A., Blanchard, T. L. y Varner, D. D. (2005). Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584-91.

Love, C. C. y Kenney, R. M. (1998). The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 50, 955-72.

Love, C. C. y Kenney, R. M. (1999). Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biology of Reproduction* 60, 615-20.

Luerssen, H., Hoyer-Fender, S. y Engel, W. (1988). The nucleotide sequence of human transition protein 1 cDNA. *Nucleic Acids Research* 16, 7723.

Mackey, Z. B., Ramos, W., Levin, D. S., Walter, C. A., McCarrey, J. R. y Tomkinson, A. E. (1997). An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Molecular and Cellular Biology* 17, 989-98.

Madrid-Bury, N., Perez-Gutierrez, J. F., Perez-Garnelo, S., Moreira, P., Pintado Sanjuanbenito, B., Gutierrez-Adan, A. y de la Fuente Martinez, J. (2005). Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-41.

Mahi, C. A. y Yanagimachi, R. (1975). Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 44, 293-6.

- Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R. y Spadafora, C.** (1997). Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and Cell Biology* 16, 1087-97.
- Malik, H. S. y Henikoff, S.** (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology* 10, 882-91.
- Manicardi, G., Bianchi, P., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. y Sakkas, D.** (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction* 52, 864-7.
- Manicardi, G., Tombacco, A., Bizzaro, D., Bianchi, P., Bianchi, U. y Sakkas, D.** (1998). DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assay. *The Histochemical Journal* 30, 33-9.
- Marcon, L. y Boissonneault, G.** (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of Reproduction* 70, 910-8.
- Marmar, J. L.** (2001). The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update* 7, 461-72.
- Marsden, M. P. y Laemmli, U. K.** (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-58.
- Marushige, Y. y Marushige, K.** (1975). Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* 250, 39-45.
- Marushige, Y. y Marushige, K.** (1978). Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* 518, 440-9.

Mate, K. E., Kosower, N. S., White, I. G. y Rodger, J. C. (1994). Fluorescent localization of thiols and disulfides in marsupial spermatozoa by bromobimane labelling. *Molecular Reproduction and Development* 37, 318-25.

Mayer, J. F., Jr., Chang, T. S. y Zirkin, B. R. (1981). Spermatogenesis in the mouse 2. Amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa. *Biology of Reproduction* 25, 1041-51.

McGhee, J. D. y Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annual Review of Biochemistry* 49, 1115-56.

McKelvey-Martin, V. J., Ho, E. T., McKeown, S. R., Johnston, S. R., McCarthy, P. J., Rajab, N. F. y Downes, C. S. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 13, 1-8.

McLachlan, R. I., Baker, H. W., Clarke, G. N., Harrison, K. L., Matson, P. L., Holden, C. A. y de Kretser, D. M. (2003). Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology* 35, 25-33.

McPherson, S. y Longo, F. (1992). Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular Reproduction and Development* 31, 268-79.

McPherson, S. y Longo, F. (1993a). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry* 37, 109-28.

McPherson, S. M. y Longo, F. J. (1993b). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Developmental Biology* 158, 122-30.

- Meeker, J. D., Singh, N. P. y Hauser, R.** (2008). Serum concentrations of estradiol and free T4 are inversely correlated with sperm DNA damage in men from an infertility clinic. *Journal of Andrology* 29, 379-88.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R. y Zhao, M.** (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-8.
- Meistrich, M. L., Reid, B. O. y Barcellona, W. J.** (1976). Changes sperm nuclei during sperimogenesis and epidymal maturation. *Experimental Cell Research* 99, 72-8.
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., Lin, R., Bhatnagar, Y. M. y Allis, C. D.** (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular Reproduction and Development* 31, 170-81.
- Michaut, M., Tomes, C. N., De Blas, G., Yunes, R. y Mayorga, L. S.** (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9996-10001.
- Mieusset, R. y Bujan, L.** (1994). The potential of mild testicular heating as a safe, effective and reversible contraceptive method for men. *International Journal of Andrology* 17, 186-91.
- Mieusset, R. y Bujan, L.** (1995). Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal of Andrology* 18, 169-84.
- Mitropoulos, D., Deliconstantinos, G., Zervas, A., Villiotou, V., Dimopoulos, C. y Stavrides, J.** (1996). Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *The Journal of Urology* 156, 1952-8.
- Moens, P. B. y Pearlman, R. E.** (1989). Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. *Chromosoma* 98, 287-94.

Mooney, J. K., Jr., Horan, A. H. y Lattimer, J. K. (1972). Motility of spermatozoa in the human epididymis. *The Journal of Urology* 108, 443-5.

Moore, C. R. y Quick, W. J. (1924). The scrotum as a temperature regulator for the testes. *American Journal of Physiology* 68, 70-9.

Morales, P., Vantman, D., Barros, C. y Vigil, P. (1991). Human spermatozoa selected by Percoll gradient or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction. *Human Reproduction* 6, 401-4.

Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E. K. y Schatten, G. (2000). Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biology of Reproduction* 63, 89-98.

Morgenthal, J. C. (1967). Notes on the spermatozoal morphology of some ungulates. *Journal of the South African Veterinary Association* 38, 271-3.

Morrell, J. M., Johannisson, A., Dalin, A. M., Hammar, L., Sandebert, T. y Rodriguez-Martinez, H. (2008). Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 2.

Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. *International Journal of Andrology* 25, 255-61.

Morris, I. D., Illott, S., Dixon, L. y Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 17, 990-8.

Morrow, E. H. y Gage, M. J. (2000). The evolution of sperm length in moths. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 267, 307-13.

Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J., Jr. y Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction* 19, 129-38.

Mulcahy, J. J. (1984). Scrotal hypothermia and the infertile man. *The Journal of Urology* 132, 469-70.

Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G. y col. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *Journal of Andrology* 21, 903-12.

Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosalvez, J., Alvarez, J. G. y Fernández, J. L. (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of Andrology* 28, 38-49.

Muriel, L., Meseguer, M., Fernández, J. L., Alvarez, J., Remohi, J., Pellicer, A. y Garrido, N. (2006). Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Human Reproduction* 21, 738-44.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12-8.

Natarajan, A. T. y Obe, G. (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases. *Chromosoma* 90, 120-7.

Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M. y Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51, 721-7.

Neild, D. N., Gadella, B. M., Agüero, A., Stout, T. A. y Colenbrander, B. (2005). Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 89, 47-56.

- Nelson, W. G., Pienta, K. J., Barrack, E. R. y Coffey, D. S.** (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 15, 457-75.
- Ng, F. L., Liu, D. Y. y Baker, H. W.** (1992). Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reproduction* 7, 261-6.
- O'Flaherty, C., Vaisheva, F., Hales, B. F., Chan, P. y Robaire, B.** (2008). Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Human Reproduction* 23, 1044-52.
- Oko, R.** (1998). Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia* 30, 193-206.
- Oko, R. J.** (1995). Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 777-97.
- Olins, A. L. y Olins, D. E.** (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-2.
- Oliva, A., Spira, A. y Multigner, L.** (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16, 1768-76.
- Oliva, R., de Mateo, S. y Estanyol, J. M.** (2009). Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9, 1004-17.
- Oliva, R. y Dixon, G. H.** (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology* 40, 25-94.
- Olive, P. L., Wlodek, D. y Banath, J. P.** (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research* 51, 4671-6.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A. J., Jr. y Alvarez, J. G.** (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction* 16, 1912-21.

Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T. F. y Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction Update* 1, 543-57.

Ombelet, W., Vandeput, H., Van de Putte, G., Cox, A., Janssen, M., Jacobs, P., Bosmans, E., Steeno, O. y Kruger, T. (1997). Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. *Human Reproduction* 12, 1458-63.

Ostermeier, G. C., Sargeant, G. A., Yandell, B. S., Evenson, D. P. y Parrish, J. J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology* 22, 595-603.

Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-8.

Padilla, S. L. y Garcia, J. E. (1989). Effect of maternal age and number of *in vitro* fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertility and Sterility* 52, 270-3.

Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Kruff, V., Chevaillier, P. y Giannakouros, T. (1999). SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Research* 27, 2972-80.

Paul, C., Murray, A. A., Spears, N. y Saunders, P. T. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136, 73-84.

Payne, J. F., Raburn, D. J., Couchman, G. M., Price, T. M., Jamison, M. G. y Walmer, D. K. (2005). Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertility and Sterility* 84, 356-64.

Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. y Demaille, J. (2003). Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from *in vitro* unfertilized human oocytes. *Human Genetics* 112, 195-203.

Perez-Llano, B., Enciso, M., Garcia-Casado, P., Sala, R. y Gosalvez, J. (2006). Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology* 66, 2137-43.

Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucker, R. M. y Keefer, C. L. (1988). Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 39, 157-67.

Phillips, D. M. (1974). *Spermiogenesis*. Nueva York: Acad. Press.

Pienta, K. J. y Coffey, D. S. (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *Journal of Cell Science*, Suplemento 1, 123-35.

Pitnick, S., Markow, T. A. y Spicer, G. S. (1995). Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10614-8.

Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. y Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5354-65.

Pogany, G. C., Corzett, M., Weston, S. y Balhorn, R. (1981). DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Experimental Cell Research* 136, 127-36.

Potts, R., Newbury, C., Smith, G., Notarianni, L. y Jefferies, T. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research* 423, 103-11.

- Pradeepa, M. M. y Rao, M. R.** (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility*, Suplemento 63, 1-10.
- Presgraves, D. C., Baker, R. H. y Wilkinson, G. S.** (1999). Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266, 1041-7.
- Prevost, J. L. y Dumas, J. B.** (1824). Deuxieme mémoire sur la génération. *Annales Des Sciences Naturelles* 2, 129-49.
- Prigent, C. y Dimitrov, S.** (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 116, 3677-85.
- Pryor, J. L. y Howards, S. S.** (1987). Varicocele. *The Urologic Clinics of North America* 14, 499-513.
- Pursel, V. G. y Johnson, L. A.** (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1, 63-8.
- Puwaravutipanich, T. y Panyim, S.** (1975). The nuclear basic proteins of human testes and ejaculated spermatozoa. *Experimental Cell Research* 90, 153-8.
- Ragni, G., Maggioni, P., Guermandi, E., Testa, A., Baroni, E., Colombo, M. y Crosignani, P. G.** (1999). Efficacy of double intrauterine insemination in controlled ovarian hyperstimulation cycles. *Fertility and Sterility* 72, 619-22.
- Rahaley, R. S. y Dennis, S. M.** (1984). Histopathology of experimental brucellosis in rams following vaccination with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal* 61, 353-6.
- Rapp, A., Bock, C., Dittmar, H. y Greulich, K. O.** (2000). UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 56, 109-17.

Requena, A., Martínez-Salazar, J., Parraga, M. y Isaza, V. (2002). Inseminación Artificial, en *Reproducción Humana*. Ed. Remohí, J., Simón C. y Pellicer, A. Madrid: McGraw-Hill.

Retief, J. D., Krajewski, C., Westerman, M., Winkfein, R. J. y Dixon, G. H. (1995a). Molecular phylogeny and evolution of marsupial protamine P1 genes. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 259, 7-14.

Retief, J. D., Rees, J. S., Westerman, M. y Dixon, G. H. (1995b). Convergent evolution of cysteine residues in sperm protamines of one genus of marsupials, the Planigales. *Molecular Biology and Evolution* 12, 708-12.

Risley, M. S., Einheber, S. y Bumcrot, D. A. (1986). Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 94, 217-27.

Rives, N., Saint Clair, A., Mazurier, S., Sibert, L., Simeon, N., Joly, G. y Mace, B. (1999). Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Human Genetics* 105, 266-72.

Rivolta, M., Cisale, H., Guidoni, J. y Fernández, H. (1995). Uso del test de endosmosis en semen descongelado ovino y bovino. *Veterinaria Argentina* 12, 602-5.

Roberts, R. J. (1976). Restriction endonucleases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 4, 123-64.

Roca, J. y Mezquita, C. (1989). DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *The EMBO Journal* 8, 1855-60.

Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C. y Dix, D. J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction* 65, 229-239.

- Rodger, J. C. y Bedford, J. M. (1982a). Induction of oestrus, recovery of gametes, and the timing of fertilization events in the opossum, *Didelphis virginiana*. *Journal of Reproduction and Fertility* 64, 159-69.
- Rodger, J. C. y Bedford, J. M. (1982b). Separation of sperm pairs and sperm-egg interaction in the opossum, *Didelphis virginiana*. *Journal of Reproduction and Fertility* 64, 171-9.
- Rodman, T. C., Litwin, S. D., Romani, M. y Vidali, G. (1979). Life history of mouse sperm protein. Intratesticular stages. *The Journal of Cell Biology* 80, 605-20.
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I. y Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO Journal* 16, 2262-70.
- Romeo, C., Ientile, R., Santoro, G., Impellizzeri, P., Turiaco, N., Impala, P., Cifala, S., Cutroneo, G., Trimarchi, F. y Gentile, C. (2001). Nitric oxide production is increased in the spermatic veins of adolescents with left idiopathic varicocele. *Journal of Pediatric Surgery* 36, 389-93.
- Rousseaux, J. y Rousseaux-Prevost, R. (1995). Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin. *Biology of Reproduction* 52, 1066-72.
- Rubes, J., Selevan, S. G., Evenson, D. P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W. A. y Perreault, S. D. (2005). Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction* 20, 2776-83.
- Rubio, C., Gil-Salom, M., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Minguez, Y., Remohi, J. y Pellicer, A. (2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Human Reproduction* 16, 2084-92.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S. y Clegg, E. D. (1993). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology* 16, 83-83.

Rybar, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatkova, M. y Rubes, J. (2004). Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic *Veterinarni Medicina* 49, 1-8.

Rydberg, B. y Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, en *DNA Repair Mechanisms* (465-468). Ed. Friedberg, E. C. y Fox C. F. Nueva York: Academic Press Inc.

Saacke, R. G. (1990). What is abnormal? And is abnormal dependent upon the animal? In *13th Technical Conference on AI and Reprod.* 67-73.

Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L. y Bame, J. H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science* 60-61, 663-77.

Saacke, R. G. y White, J. M. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proceedings of the 4th Technical Conference of the National Association of Animal Breeders*, 22-7.

Said, S., Funahashi, H. y Niwa, K. (1999). DNA stability and thiol-disulphide status of rat sperm nuclei during epididymal maturation and penetration of oocytes. *Zygote* 7, 249-54.

Sailer, B., Jost, L. y Evenson, D. P. (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to *in situ* denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal of Andrology* 16, 80-7.

Sailer, B. L., Jost, L. K. y Evenson, D. P. (1996). Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24, 167-73.

Sailer, B. L., Sarkar, L. J., Bjordahl, J. A., Jost, L. K. y Evenson, D. P. (1997). Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Journal of Andrology* 18, 294-301.

Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P. G., Bizzaro, D. y Bianchi, U. (1995). Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 52, 1149-55.

Sakkas, D., Manicardi, G. C. y Bizzaro, D. (2003). Sperm nuclear DNA damage in the human. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 518, 73-84.

Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. y Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061-7.

Sakkas, D., Umer, F., Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P., Shoukir, Y. y Campana, A. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 13, 11-9.

Saleh, R., Agarwal, A., Nelson, D., Nada, E., El-Tonsy, M., Alvarez, E., Thomas, A. J. y Sharma, R. (2002a). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78, 313-8.

Saleh, R. A. y Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23, 737-52.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A., Nelson, D. R. y Thomas, A. J. (2003a). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 79 Suplemento 3, 1597-605.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R. y Thomas, A. J., Jr. (2002b). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78, 491-9.

- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Said, T. M., Sikka, S. C. y Thomas, A. J., Jr. (2003b).** Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility* 80, 1431-6.
- Salisbury, G. W. y Baker, F. N. (1966).** Nuclear Morphology of Spermatozoa from Inbred and Linecross Hereford Bulls. *Journal of Animal Science*. 25, 476-479. .
- Salumets, A., Suikkari, A. M., Makinen, S., Karro, H., Roos, A. y Tuuri, T. (2006).** Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. *Human Reproduction* 21, 2368-74.
- Sanchez-Pena, L. C., Reyes, B. E., Lopez-Carrillo, L., Recio, R., Moran-Martinez, J., Cebrian, M. E. y Quintanilla-Vega, B. (2004).** Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 108-13.
- Santos, S. J., Singh, N. P. y Natarajan, A. T. (1997).** Fluorescence *in situ* hybridization with comets. *Experimental Cell Research* 232, 407-11.
- Saowaros, W. y Panyim, S. (1979).** The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35, 191-2.
- Sautière, P., Martinage, A., Bélaiche, D., Arkhis, A. y Chevaillier, P. (1988).** Comparison of the amino acid sequences of human protamines HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2. Structural evidence that HPS1 and HPS2 are pro-protamines. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11059-11062.
- Schierbeek, A. (1953).** The collected letters of Antoni van Leeuwenhoek. An appeal to the scientific world *Antonie van Leeuwenhoek* 19, 181-8.
- Schlesinger, M. H., Wilets, I. F. y Nagler, H. M. (1994).** Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *The Urologic Clinics of North America* 21, 517-29.

Schmid, T. E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Anderson, D. y Wyrobek, A. J. (2007). The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction* 22, 180-7.

Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J. y de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *Journal of Biological Chemistry* 277, 23028-36.

Shalgi, R., Seligman, J. y Kosower, N. S. (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biology of Reproduction* 40, 1037-45.

Shaposhnikov, S. A., Salenko, V. B., Brunborg, G., Nygren, J. y Collins, A. R. (2008). Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29, 3005-12.

Sheflin, L. G., Fucile, N. W. y Spaulding, S. W. (1991). HMG 14 and protamine enhance ligation of linear DNA to form linear multimers: phosphorylation of HMG 14 at Ser 20 specifically inhibits intermolecular DNA ligation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174, 660-6.

Silber, S. J. y Repping, S. (2002). Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Human Reproduction Update* 8, 217-29.

Sims, R. J., Nishioka, K. y Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics* 19, 629-39.

Simsek, F., Turkeri, L., Cevik, I., Bircan, K. y Akdas, A. (1998). Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Archivos Españoles de Urología* 51, 947-50.

Singh, J. y Rao, M. R. (1987). Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids *in vitro*. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *Journal of Biological Chemistry* 262, 734-40.

Singh, J. y Rao, M. R. (1988). Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochemistry International* 17, 701-10.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-91.

Singh, N. P., Muller, C. H. y Berger, R. E. (2003a). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility* 80, 1420-30.

Singh, R., Verma, H. K. y Kumar, S. (2003b). Effect of the foot-and-mouth disease vaccination on the semen quality of buffalo bulls. *The Indian Journal of Animal Sciences* 73, 1319-23.

Sinha Hikim, A. P. y Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 4, 38-47.

Smith, A. y Haaf, T. (1998). DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence *in situ* end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques* 25, 496-502.

Sotolongo, B., Huang, T. T., Isenberger, E. y Ward, W. S. (2005). An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of Andrology* 26, 272-80.

Sotolongo, B., Lino, E. y Ward, W. S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biology of Reproduction* 69, 2029-35.

Sotolongo, B. y Ward, W. S. (2000). DNA loop domain organization: the three-dimensional genomic code. *Journal of Cellular Biochemistry*, Suplemento 35, 23-6.

Spadafora, C. (1998). Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 20, 955-64.

Spallanzani, L. (1785). Expériences pour servir a l'histoire de la génération des animaux et des plantes. Paris.

Spano, M., Bonde, J., Hjollund, H., Kolstad, H., Cordelli, E. y Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility* 73, 43-50.

Spano, M., Cordelli, E., Leter, G., Lombardo, F., Lenzi, A. y Gandini, L. (1999). Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular Human Reproduction* 5, 29-37.

Spano, M., Kolstad, H., Larsen, S., Cordelli, E., Leter, G., Giwercman, A. y Bonde, J. (1998). The applicability of the flow cytometric sperm structure chromatin assay to epidemiological studies. *Human Reproduction* 13, 2495-505.

Squires, E. L. (2005). Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science* 89, 187-98.

Stefankiewicz, J., Kurzawa, R. y Drozdziak, M. (2006). Environmental factors disturbing fertility of men. *Ginekologia Polska* 77, 163-9.

Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D. y Bergmann, M. (1998). Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction* 4, 939-45.

Stevanato, J., Bertolla, R. P., Barradas, V., Spaine, D. M., Cedenho, A. P. y Ortiz, V. (2008). Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertility and Sterility* 90, 889-90.

Stockley, P., Gage, M. J., Parker, G. A. y Moller, A. P. (1997). Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *The American Naturalist* 149, 933-54.

Struchkov, V. A., Strazhevskaya, N. B. y Blokhin, D. (1992). Thiol-induced fragmentation of chromosomal DNA. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* 113, 529-31.

Sun, F., Ko, E. y Martin, R. H. (2006). Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 1.

Sun, J. G., Jurisicova, A. y Casper, R. F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction* 56, 602-7.

Sutovsky, P. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microscopy Research and Technique* 61, 88-102.

Swanson, W. J. y Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics* 3, 137-44.

Sweeney, T. E., Rozum, J. S. y Gore, R. W. (1995). Alteration of testicular microvascular pressures during venous pressure elevation. *American Journal of Physiology* 269, H37-45.

Szczygiel, M. A. y Ward, W. S. (2002). Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biology of Reproduction* 67, 1532-7.

Talebi, A. R., Khalili, M. A. y Hossaini, A. (2007). Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *International Journal of Andrology* 30, 163-69.

Tanphaichitr, N., Agulnick, A., Seibel, M. y Taymor, M. (1988). Comparison of the *in vitro* fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and Percoll gradient centrifugation. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF* 5, 119-22.

Tateno, H., Kimura, Y. y Yanagimachi, R. (2000). Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biology of Reproduction* 63, 341-6.

Templado, C., Hoang, T., Greene, C., Rademaker, A., Chernos, J. y Martin, R. (2002). Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Molecular Reproduction and Development* 61, 200-4.

Temple-Smith, P. D. (1994). Comparative structure and function of marsupial spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 6, 421-35.

Tesarik, J. (2005). Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 370-5.

Tesarik, J. y Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction* 14, 1318-23.

Tesarik, J., Greco, E. y Mendoza, C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction* 19, 611-5.

Tobita, T., Suzuki, H., Soma, K. y Nakano, M. (1983). Differential cleavages of disulfide cross-links of protamines in boar sperm nuclei. *Biochimica et Biophysica Acta* 748, 461-4.

Tomlinson, M., Moffat, O., Manicardi, G., Bizzaro, D., Afnan, M. y Sakkas, D. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* 16, 2160-2165.

Toshimori, K., Tani, I., Araki, S. y Oura, C. (1992). Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell and Tissue Research* 270, 459-68.

Tramontano, F., Malanga, M., Farina, B., Jones, R. y Quesada, P. (2000). Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expression in rat testis. *Molecular Human Reproduction* 6, 575-81.

Trasler, J. M. y Doerksen, T. (1999). Teratogen update: paternal exposures-reproductive risks. *Teratology* 60, 161-72.

Turkyilmaz, Z., Gulen, S., Sonmez, K., Karabulut, R., Dincer, S., Can Basaklar, A. y Kale, N. (2004). Increased nitric oxide is accompanied by lipid oxidation in adolescent varicocele. *International Journal of Andrology* 27, 183-7.

Twigg, J., Irvine, D. S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L. y Aitken, R. J. (1998a). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Molecular Human Reproduction* 4, 439-45.

Twigg, J. P., Irvine, D. S. y Aitken, R. J. (1998b). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13, 1864-71.

Tyndale-Biscoe, H. (1973). *Life of marsupials*. Colingwood, Australia: Csiro Publishing.

Van der Westerlaken, L. A., Naaktgeboren, N. y Helmerhorst, F. M. (1998). Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15, 359-64.

Van Duijn, C. (1954). Fluorochroming of human spermatozoa with acridine-orange. *Mikroskopie* 9, 324-33.

Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. y Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* 2, 196-206.

Vaughn, J. P., Dijkwel, P. A., Mullenders, L. H. y Hamlin, J. L. (1990). Replication forks are associated with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Research* 18, 1965-9.

Velez de la Calle, J. F., Muller, A., Walschaerts, M., Clavere, J. L., Jimenez, C., Wittemer, C. y Thonneau, P. (2008). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and Sterility* 90, 1792-9.

Vierula, M., Alanko, M., Andersson, M. y Vanha-Perttula, T. (1987). Tail stump sperm defect in Ayrshire bulls: morphogenesis of the defect. *Andrologia* 19 Número especial, 207-16.

Virro, M., Larson-Cook, K. y Evenson, D. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 81, 1289-95.

Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. y Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* 53, 133-50.

Viville, S., Mollard, R., Bach, M. L., Falquet, C., Gerlinger, P. y Warter, S. (2000). Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Human Reproduction* 15, 2563-6.

Vogelstein, B., Pardoll, D. M. y Coffey, D. S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell* 22, 79-85.

Wang, C., McDonald, V., Leung, A., Superlano, L., Berman, N., Hull, L. y Swerdloff, R. S. (1997). Effect of increased scrotal temperature on sperm production in normal men. *Fertility and Sterility* 68, 334-9.

Ward, M. A. y Ward, W. S. (2004). A model for the function of sperm DNA degradation. *Reproduction, Fertility and Development* 16, 547-54.

Ward, W. S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 48, 1193-201.

Ward, W. S. (1994). The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 55, 77-82.

Ward, W. S. y Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* 44, 569-74.

Ward, W. S., Partin, A. W. y Coffey, D. S. (1989). DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98, 153-9.

Waterhouse, K. E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D. P. y De Angelis, P. M. (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 781-8.

Weil, M., Jacobson, M. D. y Raff, M. C. (1998). Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *Journal of Cell Science* 111, 2707-15.

Weissenberg, R., Yossefi, S., Oschry, Y., Madgar, I. y Lewin, L. M. (1994). Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *International Journal of Andrology* 17, 256-61.

Weng, S., Taylor, S., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E., Beebe, S. y Oehninger, S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* 8, 984-91.

WHO. (1999). *WHO laboratory manual for the examination of the human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press.

Wiltbank, J. N. P., N.P. (1986). Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. *Theriogenology* 25, 779-83.

Winkfein, R. J., Nishikawa, S., Connor, W. y Dixon, G. H. (1993). Characterization of a marsupial sperm protamine gene and its transcripts from the North American opossum (*Didelphis marsupialis*). *European Journal of Biochemistry* 215, 63-72.

Wolf, F. (1928). *Die Natur als Arzt und Helfer*. Das Neue Naturärztliche Hausbuch: Deutsche Verlags Stuttgart Berlin & Leipzig.

Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P. y Sautiere, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80, 117-28.

Wu, X. Q. y Hecht, N. B. (2000). Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biology of Reproduction* 62, 720-5.

Wyrobek, A. J., Alhborn, T., Balhorn, R., Stanker, L. y Pinkel, D. (1990). Fluorescence *in situ* hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Molecular Reproduction and Development* 27, 200-8.

Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S., Arnheim, N., Tiemann-Boege, I., Jabs, E. W., Glaser, R. L., Pearson, F. S. y Evenson, D. (2006). Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9601-6.

Xing, W., Krishnamurthy, H. y Sairam, M. R. (2003). Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 697-701.

Yamaguchi, M., Sakatoku, J. y Takiyama, H. (1989). The application of intrascrotal deep body temperature measurement for the noninvasive diagnosis of varicoceles. *Fertility and Sterility* 52, 295-301.

Yamamoto, N. (1969). Damage, repair, and recombination. II. Effect of hydrogen peroxide on the bacteriophage genome. *Virology* 38, 457-63.

Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S. D. y Kleinfeld, R. G. (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biology of Reproduction* 44, 440-7.

Yanagimachi, R. (1994a). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-2.

Yanagimachi, R. (1994b). Mammalian fertilization, en *The physiology of reproduction* (189-317). Ed. Knobil, E. y Neill, J. D.). Nueva York: Raven Press.

Yeung, C. H., Cooper, T. G., Oberpenning, F., Schulze, H. y Nieschlag, E. (1993). Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biology of Reproduction* 49, 274-80.

Yoshinaga, K. y Toshimori, K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microscopy Research and Technique* 61, 39-45.

Yossefi, S., Oschry, Y. y Lewin, L. M. (1994). Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. *Molecular Reproduction and Development* 37, 93-8.

Younglai, E. V., Holt, D., Brown, P., Jurisicova, A. y Casper, R. F. (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction* 16, 1950-3.

Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., Weil, M. M., Behringer, R. R. y Meistrich, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4683-8.

Yunes, R., Michaut, M., Tomez, C. y Mayorga, L. S. (2000). Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 62, 1084-9.

Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N. y Parvin, J. D. (2004). Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *Journal of Biological Chemistry* 279, 21866-72.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D. y Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* 75, 674-7.

Zini, A., Blumenfeld, A., Libman, J. y Willis, J. (2005a). Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Human Reproduction* 20, 1018-21.

Zini, A., Finelli, A., Phang, D. y Jarvi, K. (2000). Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 56, 1081-4.

Zini, A., Meriano, J., Kader, K., Jarvi, K., Laskin, C. A. y Cadesky, K. (2005b). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Human Reproduction* 20, 3476-80.

Zini, A. y Sigman, M. (2009). Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* 30, 219-29.

Zorgniotti, A. W. y Macleod, J. (1973). Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertility and Sterility* 24, 854-63.

<http://www.embryology.ch/indexdu.html> 10/07/2009

AGRADECIMIENTOS

11. AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en este espacio mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado en esta etapa inicial de mi carrera científica.

A Carlos por animarme a andar por este camino.

A Jaime por permitirme comenzar un estudio de comparación de genomas de saltamontes que acabaría en esta tesis.

A Miguel por guiarme en el laboratorio hasta hoy y por tantas otras cosas.

A Carmen, Paqui, Joaquina, Mario, Pepe Bella, Pepe Martín, Paloma, Begoña, Rosa, Laura, Clara y todos los demás con los que he compartido tiempo y espacio en el laboratorio A-201.

A Marta, Angelo y Javi por compartir, aunque sólo fuera en el tiempo y no en el espacio los primeros momentos en un laboratorio.

A Turi, Moncho, Iñaki, Dani e Isaac por los innumerables ratos de cafetería y demás juntos.

A Jose Luis “el gallego” por su omnipresencia y ayuda. A Pedro del Castillo por su asesoramiento. A Juan Carlos Stockert por su ayuda científica y por la agradable cena bonaerense. A Blanca Nieto por su ayuda técnica y su apoyo moral en el “sacrificio de los tiernos animalitos”. A Pedro García-Casado y a Begoña Pérez-Llano por las muestras de semen de cerdo.

A Humberto Cisale por su cariñoso recibimiento, su calidez y su apoyo constante durante mi estancia en Buenos Aires. A todos los miembros de la cátedra de Física Biológica de la Universidad de Buenos Aires por su ayuda y acogimiento. A Deborah Neild y a todos los miembros de la cátedra de Teriogenología de la Universidad de Buenos Aires por su interés en mi trabajo y por las extracciones matutinas de semen de caballo.

A Albane, Manuel, Ivan, Jeremy, Nico, Mathieu y Josito por los miles de momentos compartidos.

A María por su hospitalidad. A Euge por su inigualable personalidad. A Fer por su cariño y sencillez. A Diana y su familia por su recibimiento y ayuda. A todas las demás personas y personajes que me crucé en Buenos Aires.

A Ashok Agarwal por permitirme pasar tres meses en el *Center for Reproductive Medicine* de la *Cleveland Clinic*. A Rakesh Sharma y Sajal Gupta por organizar seminarios aderezados con productos del *Starbucks*.

A Hussein por su amabilidad, sencillez y disposición para ayudar en todo momento. A Reda y Amr por su apoyo moral. A Nisarg por ser tan tremendamente parecido a Milhouse. A Stefan y Andreea por su compañía. A las chinas del laboratorio del al lado por ser tan eficientes como cualquiera puede imaginar.

A Jessy por constituir el principio y final de mi vida social americana.

Al *segundo* Dr. Gosálvez por su amabilidad e interés en la colaboración establecida. A María y Esther por su trabajo en la preparación de las muestras. A Miriam e Isabel por su eficacia y profesionalidad en la preparación de muestras y en la resolución de dudas.

A todos los donantes conocidos y desconocidos.

A Rubén por sus visitas sorpresa y por *todo lo demás*.

A la *gran morralla china* y sus integrantes, antes y después de la era internauta y dentro y fuera de la red por sus incontables genialidades y muestras de cariño. Aina, Salva, Gera, Cris, Beltrán, Loreta, Miki, Olmo, Enri, Marco, Ginebra, Ainara, Andrea, Rita, Pedram, Pablo, Beatriz, Juan, Boca, Aitor ... y todos los demás.

A Alma, Luz, Marisa y Juan Carlos por su cariño.

A mis padres y mi hermano por su amor y apoyo incondicional.

A Jonás por compartir su vida conmigo, por su inconmensurable ayuda, entusiasmo y paciencia y por su infinito amor, sin los que nada de esto habría sido posible.

A todos, **GRACIAS**.